

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045372**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.11.21

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)

(21) Номер заявки
202090309

(22) Дата подачи заявки
2018.07.26

(54) АНТИ-TIGIT АНТИТЕЛА

(31) 62/606,159; 20175535; 17184102.6;
62/660,640

(32) 2017.07.27; 2017.07.31; 2017.07.31;
2018.04.20

(33) US; BE; EP; US

(43) 2020.05.20

(86) PCT/US2018/043968

(87) WO 2019/023504 2019.01.31

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ИТЕОС БЕЛДЖИУМ СА (BE)

(72) Изобретатель:
**Купер Энтони (US), Кева Кристоф,
Дени Софи, Хуфд Катрин, Куенде
Джулия, Дриссан Грегори, Ламболе
Флоранс (BE)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) JOHNSTON ROBERT J ET AL.: "The Immunoreceptor TIGIT Regulates Antitumor and Antiviral CD8+T Cell Effector Function", CANCER CELL, CELL PRESS, US, vol. 26, no. 6, 26 November 2014 (2014-11-26), pages 923-937, XP029111576, ISSN: 1535-6108, DOI: 10.1016/J.CCELL.2014.10.018 cited in the application figure 3

WO-A1-2016028656

WO-A1-2016106302

WO-A2-2016191643

GLEN M. CHEW ET AL.: "TIGIT Marks Exhausted T Cells, Correlates with Disease Progression, and Serves as a Target for Immune Restoration in HIV and SIV Infection", PLOS PATHOGENS, vol. 12, no. 1, 7 January 2016 (2016-01-07), page e1005349, XP055447824, DOI: 10.1371/journal.ppat.1005349 page 8, paragraph 3 - page 10, paragraph 1; figure 6

(57) Предлагаются анти-TIGIT антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые ингибируют TIGIT-опосредованную передачу сигналов, вместе с комбинациями, содержащими указанные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, и способы их применения.

B1

045372

045372 B1

Уровень техники

Иммунотерапия рака основывается на модуляции иммунной системы для повышения распознавания и ответа против опухолевых клеток. Такая модуляция может быть достигнута множеством механизмов, включая активацию костимулирующих молекул, присутствующих в иммунных клетках, или посредством ингибирования коингибирующих рецепторов. Активация иммунного ответа представляет собой сложный механизм, включающий многочисленные клеточные популяции, такие как антиген-презентирующие клетки, важные для инициации антиген-специфического ответа, и эффекторные клетки, ответственные за разрушение опухолевых клеток. Механизмы, модулирующие активность эффекторных клеток, таких как цитотоксические Т-клетки, многочисленны и представляют собой мишень, которая является хорошим выбором, в контексте иммунотерапии рака.

TIGIT (иммунорецептор Т-клеток с доменами Ig и ITIM), также называемый WUCAM, VSIG9 или Vstm3, является коингибирующим рецептором, преимущественно экспрессируемым на НК, CD8+ и CD4+ Т-клетках, а также на регуляторных Т-клетках (Treg-клетках или просто "Treg"). TIGIT представляет собой трансмембранный белок, содержащий известный домен ITIM во внутриклеточной части, трансмембранный домен и вариабельный домен иммуноглобулина во внеклеточной части рецептора. Было описано, что несколько лигандов связываются с TIGIT-рецептором с CD155/PVR, демонстрируя наилучшую аффинность, за которым следуют CD113/PVRL3 и CD112/PVRL2 (Yu et al. (2009) Nat. Immunol. 10:48.). DNAM/CD226, известный костимуляторный рецептор, также экспрессируемый на НК и Т-клетках, конкурирует с TIGIT за связывание CD155 и CD112, но с более низкой аффинностью, что предполагает жесткий контроль активации этих эффекторных клеток во избежание неконтролируемой цитотоксичности по отношению к нормальным клеткам, экспрессирующим лиганд CD155.

Экспрессия TIGIT повышается на инфильтрирующих опухоль лимфоцитах (TIL) и в условиях заболевания, таких как ВИЧ-инфекция. Экспрессия TIGIT помечает истощенные Т-клетки, которые имеют более низкую эффекторную функцию по сравнению с отрицательными аналогами TIGIT (Kurtulus et al. (2015) J.Clin.Invest. 276:112; Chew et al. (2016) Plos Pathogens. 12). Наоборот, клетки Treg, которые экспрессируют TIGIT, проявляют повышенную иммуносупрессивную активность по сравнению с TIGIT-негативной популяцией Treg (Joller et al. (2014) Immunity. 40:569.).

Подобно другим коингибирующим рецепторам (PD1 или CTLA4), экспрессируемым на Т-клетках, которые, как было доказано, являются релевантной мишенью для иммунотерапии и для которых антагонистические антитела были одобрены для лечения рака человека, разработка антагонистического анти-TIGIT антитела может помочь включить иммунную систему и лучше бороться с раковыми клетками. Было высказано предположение, что антагонистические анти-TIGIT антитела в монотерапии или в комбинации с а-PD1 антителом могут достигать сильной противоопухолевой эффективности в доклинических моделях (Johnston et al. (2014) Cancer Cell 26:1; WO 2016/028656; US 2016/0176963; US 2016/0376365, все из которых включены в данный документ посредством ссылки).

Таким образом, антагонистические антитела, специфичные к TIGIT, которые могут ингибировать активность рецептора TIGIT, предоставляют возможность уменьшить иммуносупрессивный эффект, связанный с микроокружением опухоли, и, таким образом, повысить противоопухолевый иммунный ответ против опухолевых клеток.

Сущность изобретения

Данное изобретение относится к анти-TIGIT антителам, которые могут снижать иммуносупрессивный эффект сигналинга, опосредованного TIGIT. В частности, антитела или антигенсвязывающие фрагменты по данному изобретению могут ингибировать TIGIT-опосредованную иммуносупрессию посредством предотвращения связывания лиганда с Т-клетками (обычными $\alpha\beta$ Т-клетками и необычными $\gamma\delta$ Т-клетками) и НК-клетками и/или истощением TIGIT-положительных Treg-клеток и/или путем индукции интернализации рецептора TIGIT.

В одном аспекте данное изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который связывается с TIGIT человека, и который содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), выбранный из последовательностей HCDR1, HCDR2 и HCDR3, продемонстрированных на фиг. 1, и который дополнительно содержит вариабельный домен легкой цепи, содержащий CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3), выбранный из последовательностей LCDR1, LCDR2 и LCDR3, показанных на фиг. 2.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат комбинацию HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, причем комбинация выбрана из группы комбинаций, образованных HCDR из каждого антитела на фиг. 1, взятых с LCDR из соответствующего антитела на фиг. 2.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или антигенсвязывающий фрагмент по данному изобретению могут содержать вариабельный домен тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 211, 213, 215, 217, 219, 221, 223, 225, 227, 229, 231, 233, 235, 237, 239, 327, 329 и 331 и аминокислотных последовательностей, демонстрирующих по меньшей мере 90, 95, 97, 98 или 99% идентичности последовательности к

ним; и необязательно содержать вариабельный домен легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 212, 214, 216, 218, 220, 222, 224, 226, 228, 230, 232, 234, 236, 238, 240, 328, 330 и 332 и аминокислотных последовательностей, имеющих по меньшей мере 90%, 95%, 97% 98% или 99% идентичности последовательности.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат комбинацию вариабельного домена тяжелой цепи и вариабельного домена легкой цепи, причем комбинация выбрана из группы комбинаций, образованных VH из каждого антитела на фиг. 5, или аминокислотную последовательность, демонстрирующую по меньшей мере 90, 95, 97, 98 или 99% идентичности последовательности, взятой с VL из того же антитела на фиг. 5, или аминокислотную последовательность, демонстрирующую по меньшей мере 90, 95, 97, 98 или 99% идентичности последовательности с ней.

Наиболее предпочтительные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, представленные в данном документе, представляют собой фрагменты, основанные на CDR или полных вариабельных доменах антитела 31282, представленных в данном документе.

Как продемонстрировано в данном документе, эти предпочтительные анти-TIGIT антитела и антигенсвязывающие фрагменты на основе антитела 31282 обладают особенно удивительными и полезными свойствами. Эти свойства включают в себя: более высокую аффинность к TIGIT, экспрессируемому на CD8 Т-клетках (от здоровых доноров или от больных раком), по сравнению с каждым ранее описанным протестированным анти-TIGIT антителом; лучшую IC₅₀ для конкуренции с CD155/PVR по сравнению с каждым ранее описанным протестированным анти-TIGIT антителом; лучшее EC₅₀ в анализах активации Т-клеток по сравнению с каждым ранее описанным протестированным анти-TIGIT антителом; и сильно увеличивающуюся активность в Т-клетках периферической крови больного раком, и, что особенно важно, в инфильтрирующих опухоль лимфоцитах. Кроме того, в данном документе неожиданно продемонстрировано, что антитела и антигенсвязывающие фрагменты по данному изобретению, особенно те, которые основаны на антителе 31282, преимущественно истощают Treg клетки. То есть TIGIT-экспрессирующие Treg-клетки, подвергнутые действию анти-TIGIT-антител, подвергаются лизису в большей пропорции по сравнению с обычными CD4 и CD8 Т-клетками. Это удивительно, потому что обычные CD4 и CD8 Т-клетки также экспрессируют TIGIT, но не подвергаются лизису клеток в той же степени при контакте с антителами. Кроме того, неожиданно продемонстрировано, что антитела и антигенсвязывающие фрагменты согласно данному изобретению, особенно те, которые основаны на антителе 31282, не только стимулируют обычную провоспалительную активность Т-клеток, но также увеличивают активность необычных γδ Т-клеток.

Таким образом, в определенных предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, в данном документе представлено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащий HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где:

HCDR1 содержит или состоит из SEQ ID NO: 16 (YTFTSYMH),

HCDR2 содержит или состоит из SEQ ID NO: 17 (VIGPSGASTSYAQKFQG),

HCDR3 содержит или состоит из SEQ ID NO: 18 (ARDHSDYWSGIMEV),

LCDR1 содержит или состоит из SEQ ID NO: 61 (RASQSVRSSLA),

LCDR2 содержит или состоит из SEQ ID NO: 62 (GASSRAT) и

LCDR3 содержит или состоит из SEQ ID NO: 63 (QQYFSPWT).

В некоторых таких вариантах осуществления данного изобретения, вариабельный домен тяжелой цепи содержит или состоит из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 221 или аминокислотной последовательностью, проявляющей по меньшей мере 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с ней, и вариабельный домен легкой цепи содержит или состоит из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 222 или аминокислотной последовательностью, проявляющей по меньшей мере 90, 95, 97, 98 или 99% идентичности последовательности с ней.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, анти-TIGIT антитело представляет собой антитело 31282, описанное в данном документе.

В дополнительном аспекте данное изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который перекрестно конкурирует за связывание с TIGIT человека с антителом согласно первому аспекту изобретения, например, антителом, приведенным в качестве примера в данном документе.

В дополнительном аспекте данное изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который связывается с тем же эпитопом, что и антитело в соответствии с первым аспектом изобретения, например, с антителом, приведенным в качестве примера в данном документе.

В следующем аспекте данное изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который связывается с эпитопом TIGIT человека, содержащем остатки TIGIT Q56 и I109, необязательно содержащем остатки Q56, N58 и I109. В предпочтительных вариантах осуществления

данного изобретения, предлагается антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с эпитопом TIGIT человека, содержащем остатки TIGIT Q56, N58, E60, I68, L73, H76 и I109.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом TIGIT человека, состоящем из остатков TIGIT Q56, N58, E60, I68, L73, H76 и I109.

В дополнительном аспекте данное изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который связывается с TIGIT человека и который не конкурирует с CD155 за связывание TIGIT.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с TIGIT человека и которое не конкурирует с CD155 за связывание TIGIT, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где HCDR1 содержит или состоит из SEQ ID NO: 280, HCDR2 содержит или состоит из SEQ ID NO: 281, HCDR3 содержит или состоит из SEQ ID NO: 282, и LCDR1 содержит или состоит из SEQ ID NO: 292, LCDR2 содержит или состоит из SEQ ID NO: 293, и LCDR3 содержит или состоит из SEQ ID NO: 294.

В некоторых таких вариантах осуществления данного изобретения, переменный домен тяжелой цепи содержит или состоит из аминокислотной последовательности, показанной как SEQ ID NO: 333 или аминокислотной последовательностью, проявляющей по меньшей мере 90, 95, 97, 98 или 99% идентичности последовательности с ней, и переменный домен легкой цепи содержит или состоит из аминокислотной последовательности, показанной как SEQ ID NO: 334 или аминокислотной последовательностью, проявляющей по меньшей мере 90, 95, 97, 98 или 99% идентичности последовательности с ней.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, антитело, которое связывается с TIGIT человека и которое не конкурирует с CD155 за связывание TIGIT, содержит переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, при этом HCDR1 содержит SEQ ID NO: 353, HCDR2 содержит SEQ ID NO: 354, HCDR3 содержит SEQ ID NO: 355, LCDR1 содержит SEQ ID NO: 356, LCDR2 содержит SEQ ID NO: 357, LCDR3 содержит SEQ ID NO: 358.

В некоторых таких вариантах осуществления данного изобретения, переменный домен тяжелой цепи может содержать аминокислотную последовательность, показанную как SEQ ID NO: 367, или аминокислотную последовательность, проявляющую идентичность последовательности по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99%, и переменный домен легкой цепи может содержать аминокислотную последовательность, показанную как SEQ ID NO: 368 или аминокислотной последовательностью, проявляющей по меньшей мере 90, 95, 97, 98 или 99% идентичности последовательности с ней.

В дополнительном аспекте данное изобретение относится к изолированному анти-TIGIT антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который предпочтительно истощает TIGIT-экспрессирующие Трег клетки, необязательно, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно первому аспекту изобретения, например, антитело, приведенное в качестве примера в данном документе.

В дополнительном аспекте данное изобретение относится к аффинному варианту антитела в соответствии с другими аспектами изобретения, например, антитела, приведенного в качестве примера в данном документе.

В дополнительном аспекте данное изобретение относится к выделенному полинуклеотиду или комбинации выделенных полинуклеотидов, кодирующих антитело или антигенсвязывающий фрагмент, в соответствии с любым другим аспектом изобретения, например, антителом, приведенным в качестве примера в данном документе.

В дополнительном аспекте данное изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему домен VH и/или VL анти-TIGIT антитела, при этом полинуклеотид содержит одну или более последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 241-270, 335-342 и 369-370.

В дополнительном аспекте данное изобретение относится к экспрессионному вектору, содержащему полинуклеотид или комбинацию полинуклеотидов по данному изобретению, функционально связанных с регуляторными последовательностями, которые обеспечивают экспрессию антигенсвязывающего полипептида в клетке-хозяине или бесклеточной системе экспрессии.

В дополнительном аспекте данное изобретение относится к клетке-хозяину или бесклеточной системе экспрессии, содержащей вектор экспрессии в соответствии с данным изобретением.

В дополнительном аспекте данное изобретение относится к способу получения рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, который включает культивирование клетки-хозяина или бесклеточной системы экспрессии по данному изобретению в условиях, которые обеспечивают экспрессию антитела или антигенсвязывающего фрагмента и восстановление экспрессированного антитела или антигенсвязывающего фрагмента.

В дополнительном аспекте данное изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей антитело или антигенсвязывающий фрагмент по данному изобретению, например, антитело, приведенное в качестве примера в данном документе, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель.

В дополнительном аспекте данное изобретение относится к антителу или антигенсвязывающему

фрагменту по данному изобретению или фармацевтической композиции по данному изобретению для применения в терапии.

В дополнительном аспекте данное изобретение относится к антителу или антигенсвязывающему фрагменту согласно данному изобретению (например, к антителу, приведенному в качестве примера в данном документе) или фармацевтической композиции по данному изобретению для применения в способе лечения рака.

В дополнительном аспекте данное изобретение относится к антителу или антигенсвязывающему фрагменту согласно данному изобретению (например, к антителу, приведенному в качестве примера в данном документе) или фармацевтической композиции по данному изобретению для применения в способе лечения вирусной инфекции, необязательно ЦМВ инфекции.

В дополнительном аспекте данное изобретение относится к способу лечения рака у субъекта, включающему введение субъекту эффективного количества антитела или антигенсвязывающего фрагмента по данному изобретению (например, антитела, приведенного в качестве примера в данном документе) или фармацевтической композиции по данному изобретению субъекту тем самым излечивая рак.

В дополнительном аспекте предложен способ лечения вирусной инфекции у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества антитела или антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с данным изобретением или фармацевтической композиции в соответствии с данным изобретением с целью лечения вирусной инфекции. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения вирусная инфекция представляет собой ЦМВ инфекцию.

В дополнительном аспекте предоставлен способ стимулирования активности Т-клеток, включающий приведение в контакт популяции Т-клеток с антителом или антигенсвязывающим фрагментом согласно данному изобретению. В определенных вариантах осуществления данного изобретения, способ стимулирует активность $\alpha\beta$ Т-клеток. В определенных вариантах осуществления данного изобретения, способ стимулирует активность $\gamma\delta$ Т-клеток. В определенных вариантах осуществления данного изобретения, способ выполняется *in vitro*. В определенных вариантах осуществления данного изобретения, способ выполняется *in vivo*, например, у субъекта человека.

В определенных вариантах осуществления данного изобретения предлагается способ согласно данному изобретению или антителу, или его антигенсвязывающий фрагмент, или фармацевтическая композиция для использования в способе согласно данному изобретению, при этом способ дополнительно включает введение одного или более дополнительных терапевтических агентов. В определенных предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, один или более дополнительных агентов выбирают из: химиотерапевтического агента, анти-PD1 антитела, анти-PD-L1 антитела, анти-41 BB антитела, анти-OX40 антитела, анти-GITR антитела и анти-ICOS антитела.

В дополнительном аспекте предложена комбинация, содержащая анти-TIGIT антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и одно или более из химиотерапевтического агента, анти-PD1 антитела, анти-PD-L1 антитела, анти-41BB антитела, анти-OX40 антитела, анти-GITR антитела и анти-ICOS антитела. В дополнительном аспекте предложена комбинация согласно данному изобретению для применения в терапии. В дополнительном аспекте предложена комбинация согласно данному изобретению для применения в способе лечения рака или для применения в способе лечения вирусной инфекции. В дополнительном аспекте предложена комбинация согласно данному изобретению для использования в способе согласно данному изобретению. В предпочтительном варианте осуществления изобретения анти-TIGIT антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело по данному изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент.

Во всех соответствующих аспектах предпочтительно, чтобы любой подлежащий лечению субъект был человеком. Во всех соответствующих аспектах предпочтительно, чтобы клетки (например, Т-клетки), контактирующие с антителами по данному изобретению, представляли собой клетки человека (например, Т-клетки человека).

Если это технически несовместимо или не указано иное, любой описанный предпочтительный вариант осуществления изобретения может при желании использоваться в сочетании с одним или более из всех других предпочтительных вариантов осуществления изобретения.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1. Таблица, представляющая последовательности определяющего комплементарность участка (CDR) переменного домена тяжелой цепи (VH) антител по данному изобретению.

Фиг. 2. Таблица, представляющая последовательности CDR переменного домена легкой цепи (VL) антител по данному изобретению.

Фиг. 3. Таблица, представляющая последовательности каркаса (FR) переменного домена тяжелой цепи (VH) антител по данному изобретению.

Фиг. 4. Таблица, представляющая последовательности каркаса (FR) переменного домена легкой цепи (VL) антител по данному изобретению.

Фиг. 5. Таблица, представляющая аминокислотные последовательности переменного домена тяжелой цепи (VH) и переменного домена легкой цепи (VL) антител по данному изобретению.

Фиг. 6. Таблица, представляющая последовательности полинуклеотидов, кодирующих домены VH и VL антител по данному изобретению.

Фиг. 7. График, демонстрирующий результаты анализа конкуренции между hCD155 и анти-TIGIT антителом для связывания с Jurkat-hTIGIT.

Фиг. 8(A). График, демонстрирующий долю TIGIT-положительных клеток в определенных популяциях Т-клеток МКПК от 7 здоровых человеческих доноров. 8(B). График, демонстрирующий долю TIGIT-положительных клеток в различных иммунных популяциях МКПК от 7 здоровых человеческих доноров.

Фиг. 9 График, демонстрирующий результаты анализа связывания клонов анти-TIGIT антител на Jurkat-hTIGIT.

Фиг. 10(A и B). Графики, демонстрирующие результаты анализа связывания анти-TIGIT антитела на первичных CD8⁺ Т-клетках от МКПК здоровых людей. 10(C). График, демонстрирующий результаты анализа связывания анти-TIGIT-антитела с первичными CD8⁺ Т-клетками памяти и Treg от МКПК здоровых людей.

Фиг. 11. Графики, демонстрирующие результаты анализа связывания анти-TIGIT-антитела на первичных CD8⁺ Т-клетках МКПК от здоровых яванцев

Фиг. 12. Графики, демонстрирующие действие анти-TIGIT-антител в биоанализе CHO-TCR-CD155 и Jurkat-hTIGIT.

Фиг. 13. Графики, демонстрирующие влияние анти-TIGIT-антител на увеличение секреции ИФНγ в функциональном анализе на первичных CD8 Т-клетках человека от здоровых доноров, активированных клетками CHO-TCR-CD155.

Фиг. 14. Гистограммы, демонстрирующие влияние анти-TIGIT-антител на увеличение секреции ИФНγ в функциональном анализе на первичных CD8⁺ TIL человека из асцита яичников, активированного клетками CHO-TCR-CD155.

Фиг. 15(A). График, демонстрирующий результаты конкурентного анализа между CD155 мыши и анти-TIGIT-антитела для связывания с Jurkat-mTIGIT. 15(B). График, демонстрирующий влияние анти-TIGIT антитела на увеличение секреции ИФНγ в функциональном анализе на мышинных OT-1 Т-клетках. 15(C). График, демонстрирующий влияние анти-TIGIT-антитела на увеличение цитотоксичности в функциональном анализе на мышинных OT-1 Т-клетках.

Фиг. 16(A). График, демонстрирующий противоопухолевую эффективность анти-TIGIT-антитела в монотерапии на модели опухоли CT26. 16(B и C). Графики, демонстрирующие противоопухолевую эффективность анти-TIGIT-антитела в комбинации с анти-PD1 в модели опухоли CT26.

Фиг. 17(A). График, демонстрирующий изотип-зависимую противоопухолевую эффективность анти-TIGIT-антитела в монотерапии на модели опухоли CT26. 17(B). График, демонстрирующий изотип-зависимую противоопухолевую эффективность анти-TIGIT-антитела в комбинации с анти-PD1 на модели опухоли CT26.

Фиг. 18(A и G). Графики, демонстрирующие модуляцию доли Treg-клетки в общей популяции CD4⁺ Т-клетки в опухоли CT26, обработанной анти-TIGIT антителом в монотерапии или в комбинации с анти-PD1 антителом. 18(B и H). Графики, показывающие модуляцию доли CD8⁺ Т-клетки в общей популяции CD45⁺ в опухоли CT26, обработанной анти-TIGIT-антителом в монотерапии или комбинации с анти-PD1. 18(C и I). Графики, демонстрирующие модуляцию соотношения Т-клетки CD8⁺/Treg в опухоли CT26, обработанной анти-TIGIT антителом в монотерапии или в комбинации с анти-PD1 антителом. 18(D и J). График, демонстрирующий модуляцию секретирующих ИФНγ CD4⁺ Т-клеток в опухоли CT26, обработанной анти-TIGIT антителом в монотерапии или в комбинации с анти-PD1. 18(E). График, демонстрирующий модуляцию секретирующих ИФНγ CD8⁺ Т-клеток в опухоли CT26, обработанной анти-TIGIT антителом. 18(L и F). Графики, демонстрирующие соотношение секретирующих ИФНγ/ИЛ-10 CD4⁺ Т-клеток в опухоли CT26, обработанной анти-TIGIT антителом в монотерапии или в комбинации с анти-PD1. 18(K). График, демонстрирующий модуляцию секретирующих ИЛ-10 CD4⁺ Т-клеток в опухоли CT26, обработанной анти-TIGIT антителом в комбинации с анти-PD1 антителом.

Фиг. 19(A). Диаграмма рассеяния (volcano plot), демонстрирующая эффект обработки анти-TIGIT антителом для модуляции экспрессии гена в опухоли CT26 и полученная анализом NanoString. 19(B). Блочная диаграмма, демонстрирующая модуляцию цитотоксического показателя в опухоли CT26, обработанной анти-TIGIT-антителом в монотерапии или комбинации с анти-PD1. 19(C). Блочная диаграмма, демонстрирующая модуляцию показателя CD8⁺ Т-клеток в опухоли CT26, обработанной анти-TIGIT-антителом в монотерапии или комбинации с анти-PD1.

Фиг. 20(A). Гистограммы, демонстрирующие долю популяций TIGIT⁺ CD4⁺, CD8⁺ Т-клеток и Treg в МКПК от здоровых добровольцев-людей. 20(B). График, демонстрирующий *in vitro* цитотоксический эффект анти-TIGIT-антитела на обычные популяции CD4⁺, CD8⁺ Т-клеток и Treg в МКПК от здоровых добровольцев-людей.

Фиг. 21. График, демонстрирующий влияние *ex-vivo* цитотоксичности анти-TIGIT антитела на обычные популяции CD4⁺, CD8⁺ Т-клеток и Treg в опухоли CT26.

Фиг. 22(A). График, демонстрирующий результаты анализа связывания клонов анти-TIGIT антител

на Jurkat-hTIGIT клетках. 22(B). График, демонстрирующий результаты анализа связывания клонов анти-TIGIT антител на первичных CD8⁺ Т-клетках от МКПК здоровых людей. 22(C). График, демонстрирующий результаты анализа связывания клонов анти-TIGIT антител на первичных CD8⁺ Т-клетках от МКПК больных раком.

Фиг. 23. График, демонстрирующий результаты анализа конкуренции между человеческими CD155 и клонами анти-TIGIT антител за связывание с Jurkat-hTIGIT.

Фиг. 24. График, демонстрирующий функциональную характеристику антагониста а-TIGIT клонов. 24(A). Графики, демонстрирующие влияние анти-TIGIT антител в функциональном анализе с использованием эффекторных клеток Jurkat-hTIGIT (анализ репортерного гена люциферазы). 24(B). Графики, демонстрирующие эффект анти-TIGIT антител в функциональном анализе, измеряющем секрецию ИФНг с помощью первичных CD8⁺ Т-клеток человека от здоровых добровольцев. 24(C). График, демонстрирующий влияние клона 31282 анти-TIGIT антитела в функциональном анализе, измеряющем секрецию ИФНг с помощью CD3⁺ Т-клетки больного раком из МКПК. 24(D). График, демонстрирующий влияние клона 31282 анти-TIGIT антитела в функциональном анализе, измеряющем внутриклеточное окрашивание цитокинов в TIL или МКПК больного раком.

Фиг. 25. Цитотоксическая активность клона 31282a-TIGIT в отношении CD4⁺ или CD8⁺ Т-клеток общей памяти и популяций Treg в МКПК от больного раком.

Фиг. 26. График, демонстрирующий характеристику экспрессии TIGIT на иммунных популяциях от больных раком. 26(A). Частота экспрессии TIGIT в иммунных популяциях МКПК и TIL больных раком. (B) Абсолютная количественная оценка экспрессии TIGIT в иммунных популяциях от МКПК и TIL больных раком.

Фиг. 27(A). Структура комплекса Fab :TIGIT продемонстрирована в виде ленточной диаграммы. 27(B). Интерфейс полного связывания между клоном 31282 и TIGIT. 27(C). Связывающая поверхность раздела между клоном 31282 и TIGIT, показывающая связанные остатки.

Фиг. 28. Анализ конкуренции между анти-TIGIT клонами 31282 и 32959.

Фиг. 29. Измерение концентрации в плазме анти-TIGIT клона 31282 после в/в введения однократной дозы 0,1 мг/кг (верхний ряд), 1 мг/кг (средний ряд) или 10 мг/кг (нижний ряд) у обезьяны яванца (*Супомолгус*). Левая колонка: 31282 IgG1; правая колонка 31282 IgG4.

Фиг. 30. График, демонстрирующий характеристику экспрессии TIGIT на злокачественных и нормальных популяциях CD4⁺ Т-клеток от пациента с синдромом Сезари. 30(A). Стратегия стробирования для отделения злокачественных и нормальных CD4⁺ Т-клеток. 30(B). MFI для окрашивания TIGIT на 2 различных популяциях.

Фиг. 31. График, демонстрирующий характеристику экспрессии TIGIT на злокачественных и нормальных популяциях В-клеток от пациента с ХЛЛ. 31(A). Стратегия стробирования для отделения злокачественных и нормальных В-клеток. 31(B). MFI для окрашивания TIGIT на 2 различных популяциях.

Фиг. 32(A-C). График, демонстрирующий кривые роста опухоли у мышей, инокулированных опухольями EL4-mTIGIT. 32(A). Срединные кривые роста опухоли. 32(B). Кривые роста отдельных опухолей у мышей, получавших антитело изотипического контроля hIgG1. 32(C). Кривые роста отдельных опухолей у мышей, получавших суррогатный антагонист а-TIGIT антитела мыши (hIgG1). 32(D-F). График, демонстрирующий кривые роста опухоли у мышей, инокулированных опухольями EL4-GFP. 32(D). Срединные кривые роста опухоли. 32(E). Кривые роста отдельных опухолей у мышей, получавших антитело изотипического контроля hIgG1. 32(F). Кривые роста отдельных опухолей у мышей, получавших суррогатный антагонист а-TIGIT (hIgG1).

Фиг. 33(A-D). Графики, демонстрирующие кривые роста опухоли у мышей, инокулированных опухольями CT26. 33(A). Кривые роста медианных и отдельных опухолей и для мышей, получавших анти-TIGIT антитела и анти-4-1BB антитела. 33(B). Кривые роста медианных и отдельных опухолей и для мышей, получавших анти-TIGIT антитела и анти-ОХ-40 антитела. 33(C). Кривые роста медианных и отдельных опухолей и для мышей, получавших анти-TIGIT антитела и анти-GITR антитела. 33(D). Кривые роста медианных и отдельных опухолей и для мышей, получавших анти-TIGIT антитела и анти-ICOS антитела.

Фиг. 34. Графики, демонстрирующие влияние анти-TIGIT антител на $\gamma\delta$ Т-клетки. 34(A). Медианная доля TIGIT-положительных клеток и MFI сигнала TIGIT в популяциях V δ 2⁺ $\gamma\delta$ Т-клеток МКПК от CMV-положительных и отрицательных доноров человека. 34(B). График, демонстрирующий активность анти-TIGIT Ат в отношении увеличения секреции ИФНг в функциональном анализе на изолированных первичных человеческих V δ 1⁺ $\gamma\delta$ Т-клетках. 34(C). График, демонстрирующий активность анти-TIGIT Ат в отношении увеличения секреции ИФНг в функциональном анализе общих МКПК.

Подробное описание изобретения

Используемый в данном документе термин "иммуноглобулин" включает полипептид, имеющий комбинацию двух тяжелых и двух легких цепей, независимо от того, обладает ли он какой-либо соответствующей специфической иммунореактивностью. "Антитела" относятся к таким сборкам, которые обладают значительной известной специфической иммунореактивной активностью в отношении интересую-

шего антигена (например, TIGIT). Термин "анти-TIGIT антитела" или "анти-TIGIT антитела" используются в данном документе для обозначения антител, которые проявляют иммунологическую специфичность к белку TIGIT. Антитела и иммуноглобулины содержат легкие и тяжелые цепи, с ковалентной связью между ними или без нее. Основные структуры иммуноглобулина в системах позвоночных относительно хорошо изучены.

Общий термин "иммуноглобулин" включает пять различных классов антител, которые можно различить биохимически. Хотя все пять классов антител входят в объем данного изобретения, последующее обсуждение, как правило, будет направлено на класс IgG молекул иммуноглобулина. Что касается IgG, иммуноглобулины содержат две идентичные легкие полипептидные цепи с молекулярной массой приблизительно 23000 дальтон и две идентичные тяжелые цепи с молекулярной массой 53000-70000. Четыре цепи соединены дисульфидными связями в конфигурации "Y", в которой легкие цепи заключают в себе тяжелые цепи, начинающиеся в устье "Y" и продолжающиеся через переменный участок.

Легкие цепи антитела классифицируются как каппа или лямбда (κ , λ). Каждый класс тяжелой цепи может быть связан с легкой цепью каппа или лямбда. В общем, легкая и тяжелая цепи ковалентно связаны друг с другом, а "хвостовые" части двух тяжелых цепей связаны друг с другом ковалентными дисульфидными связями или нековалентными связями, когда иммуноглобулины производятся В-клетками или генетически сконструированными клетками-хозяевами. В тяжелой цепи аминокислотные последовательности проходят от N-конца на разветвленных концах Y-конфигурации до C-конца в нижней части каждой цепи. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что тяжелые цепи классифицируются как гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон (γ , μ , α , δ , ϵ) с некоторыми подклассами среди них (например, $\gamma 1$ - $\gamma 4$). Именно природа этой цепи определяет "класс" антитела как IgG, IgM, IgA, IgD или IgE соответственно. Подклассы иммуноглобулинов (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и т.д., хорошо охарактеризованы и, как известно, придают функциональную специализацию. Модифицированные версии каждого из этих классов и изотипов легко различимы специалистам в данной области с учетом данного описания и, соответственно, находятся в пределах объема данного изобретения.

Как указано выше, переменный участок антитела позволяет антителу селективно распознавать и специфически связывать эпитопы на антигенах. То есть домен VL и домен VH антитела объединяются, образуя переменный участок, который определяет трехмерный сайт связывания антигена. Эта четвертичная структура антитела образует антигенсвязывающий сайт, присутствующий в конце каждого плеча Y. Более конкретно, антигенсвязывающий сайт определяется тремя определяющими комплементарность участками (CDR) на каждой из цепей VH и VL.

Используемые в данном документе термины "белок TIGIT" или "антиген TIGIT" или "TIGIT" используются взаимозаменяемо и относятся к иммунорецептору T-клеток человека (инвентарный номер GenBank: NM173799), который связывает рецептор полиовируса (PVR - так же известный как CD155). TIGIT также известен как VSIG9, VSTM3 или WUCAM. Ссылка на TIGIT включает нативный белок TIGIT человека, естественно экспрессируемый в человеке-хозяине и/или на поверхности культивируемых клеточных линий человека, а также рекомбинантные формы и их фрагменты, а также встречающиеся в природе мутантные формы.

Используемый в данном документе термин "сайт связывания" включает участок полипептида, который ответственен за избирательное связывание с интересующим антигеном-мишенью (например, TIGIT). Связывающие домены содержат по меньшей мере один сайт связывания. Иллюстративные связывающие домены включают переменный домен антитела. Молекулы антитела по данному изобретению могут содержать один сайт связывания или несколько (например, два, три или четыре) сайтов связывания.

Используемый в данном документе термин "полученный из" указанного белка (например, антитела TIGIT или его антигенсвязывающего фрагмента) относится к происхождению полипептида. В одном варианте осуществления изобретения, полипептид или аминокислотная последовательность, которая получена из конкретного исходного полипептида, представляет собой последовательность CDR или связанную с ней последовательность. В одном варианте осуществления изобретения, аминокислотная последовательность, которая получена из конкретного исходного полипептида, не является смежной. Например, в одном варианте осуществления изобретения, один, два, три, четыре, пять или шесть CDR получены из исходного антитела. В одном варианте осуществления изобретения, полипептид или аминокислотная последовательность, которая получена из конкретного исходного полипептида или аминокислотной последовательности, имеет аминокислотную последовательность, которая по существу идентична последовательности исходной последовательности или ее части, где часть состоит по меньшей мере из 3-5 аминокислот, по меньшей мере 5-10 аминокислот, по меньшей мере 10-20 аминокислот, по меньшей мере 20-30 аминокислот или, по меньшей мере 30-50 аминокислот, или которые можно идентифицировать другим специалистам в данной области техники как происходящие из начальной последовательности. В одном варианте осуществления изобретения, одну или более последовательностей CDR, полученных из исходного антитела, изменяют для получения вариантов последовательностей CDR, например аффинных

вариантов, причем варианты последовательностей CDR сохраняют активность связывания TIGIT.

Используемый в данном документе термин "консервативная аминокислотная замена" означает замену аминокислотного остатка аминокислотным остатком, имеющим сходную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые цепи, были определены в данной области техники, включая основные боковые цепи (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотные боковые цепи (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, необязательный аминокислотный остаток в полипептиде иммуноглобулина может быть заменен другим аминокислотным остатком из того же семейства боковых цепей. В другом варианте осуществления изобретения, цепочка аминокислот может быть заменена структурно подобной цепочкой, которая отличается по порядку и/или составу членов семейства боковых цепей.

Используемый в данном документе термин "часть тяжелой цепи" включает аминокислотные последовательности, полученные из константных доменов тяжелой цепи иммуноглобулина. Полипептид, содержащий часть тяжелой цепи, содержит по меньшей мере одно из: домена СН1, шарнирного (например, верхнего, среднего и/или нижнего шарнирного домена) домена, домена СН2, домена СН3, или их варианта или фрагмента. В одном варианте осуществления изобретения, антитело или антигенсвязывающий фрагмент по данному изобретению может содержать Fc-часть тяжелой цепи иммуноглобулина (например, шарнирную часть, домен СН2 и домен СН3). В другом варианте осуществления изобретения, антитело или антигенсвязывающий фрагмент по данному изобретению может не иметь по меньшей мере части константного домена (например, всего или части домена СН2). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, по меньшей мере один и предпочтительно все константные домены получены из тяжелой цепи иммуноглобулина человека. Например, в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения, часть тяжелой цепи содержит полностью человеческий шарнирный домен. В других предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, часть тяжелой цепи содержит полностью человеческую Fc-часть (например, последовательности шарнира, доменов СН2 и СН3 из человеческого иммуноглобулина).

В определенных вариантах осуществления данного изобретения, составляющие константные домены части тяжелой цепи происходят из разных молекул иммуноглобулина. Например, часть тяжелой цепи полипептида может содержать домен СН2, полученный из молекулы IgG1, и шарнирный участок, полученный из молекулы IgG3 или IgG4. В других вариантах осуществления данного изобретения, константные домены представляют собой химерные домены, содержащие части различных молекул иммуноглобулина. Например, шарнир может содержать первую часть из молекулы IgG1 и вторую часть из молекулы IgG3 или IgG4. Как указано выше, специалисту в данной области будет понятно, что константные домены части тяжелой цепи могут быть модифицированы таким образом, что они отличаются по аминокислотной последовательности от встречающейся в природе молекулы (дикого типа) иммуноглобулина. То есть полипептиды по данному изобретению, описанные в данном документе, могут содержать изменения или модификации одного или более константных доменов тяжелой цепи (СН1, шарнир, СН2 или СН3) и/или домена константного участка легкой цепи (СL). Типичные модификации включают добавления, делеции или замены одной или более аминокислот в одном или более доменах.

Используемые в данном документе термины "вариабельный участок" и "вариабельный домен" используются взаимозаменяемо и имеют одинаковое значение. Термин "вариабельный" относится к тому факту, что определенные части вариабельных доменов VH и VL сильно различаются по последовательности среди антител и используются в связывании и специфичности каждого конкретного антитела для его антигена-мишени. Однако вариабельность неравномерно распределена по вариабельным доменам антител. Она сконцентрирована в трех сегментах, называемых "гипервариабельными петлями" в каждом из домена VL и домена VH, которые образуют часть сайта связывания антигена. Первая, вторая и третья гипервариабельные петли домена легкой цепи V_{λ} упоминаются в данном документе как L1(λ), L2(λ) и L3(λ) и могут быть определены как содержащие остатки 24-33 (L1(λ), состоящая из 9, 10 или 11 аминокислотных остатков), 49-53 (L2(λ), состоящая из 3 остатков) и 90-96 (L3(λ), состоящая из 5 остатков) в домене VL (Morea et al., Methods 20, 267-279, 2000). Первая, вторая и третья гипервариабельные петли домена легкой цепи V_{κ} упоминаются в данном документе как L1(κ), L2(κ) и L3(κ) и могут быть определены как содержащие остатки 25-33 (L1(κ), состоящая из 6, 7, 8, 11, 12 или 13 остатков), 49-53 (L2(κ), состоящая из 3 остатков) и 90-97 (L3(κ), состоящая из 6 остатков) в домене VL (Morea et al., Methods 20, 267-279, 2000). Первая, вторая и третья гипервариабельные петли домена VH упоминаются в данном документе как H1, H2 и H3 и могут быть определены как содержащие остатки 25-33 (H1, состоящая из 7, 8 или 9 остатков), 52-56 (H2, состоящая из 3 или 4 остатков) и 91-105 (H3, сильно варьирующая по длине) в домене VH (Morea et al., Methods 20, 267-279, 2000).

Если не указано иное, термины L1, L2 и L3 соответственно относятся к первой, второй и третьей ги-

первариабельным петлям домена VL и охватывают гипервариабельные петли, полученные как из изо-типов V_{каппа}, так и из V_{лямбда}. Термины H1, H2 и H3 соответственно относятся к первой, второй и третьей гипервариабельным петлям домена VH и охватывают гипервариабельные петли, полученные из любого из известных изо-типов тяжелой цепи, включая γ , ϵ , δ , α или μ .

Гипервариабельные петли L1, L2, L3, H1, H2 и H3 могут каждый составлять часть "определяющего комплементарность участка" или "CDR", как определено ниже. Термины "гипервариабельная петля" и "определяющий комплементарность участок" не являются строго синонимичными, поскольку гипервариабельные петли (HV) определяются на основе структуры, тогда как определяющие комплементарность участки (CDR), определяются на основе изменчивости последовательности (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991) и пределы HV и CDR могут быть различными в некоторых доменах VH и VL.

CDR доменов VL и VH обычно можно определить как содержащие следующие аминокислоты: остатки 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3) в переменном домене легкой цепи, и остатки 31-35 или 31-35b (HCDR1), 50-65 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3) в переменном домене тяжелой цепи; (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991). Таким образом, HV могут содержаться в соответствующих CDR, и ссылки в данном документе на "гипервариабельные петли" доменов VH и VL следует интерпретировать как также охватывающие соответствующие CDR, и наоборот, если не указано иное.

Более высоко консервативные части переменных доменов называются каркасным участком (FR), как определено ниже. Каждый переменный домен нативной тяжелой и легкой цепей содержит четыре FR (FR1, FR2, FR3 и FR4 соответственно), в значительной степени принимающих конфигурацию β -листа, соединенных тремя гипервариабельными петлями. Гипервариабельные петли в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости FR и, вместе с гипервариабельными петлями из другой цепи, способствуют образованию антигенсвязывающего сайта антител. Структурный анализ антител выявил связь между последовательностью и формой сайта связывания, образованного определяющими комплементарность участками (Chothia et al., J. Mol. Biol. 227, 799-817, 1992; Tramontano et al., J. Mol. Biol. 215, 175-182 (1990). Несмотря на их высокую изменчивость последовательности, пять из шести петель принимают только небольшой репертуар конформаций главной цепи, называемых "каноническими структурами". Эти конформации, во-первых, определяются длиной петель и, во-вторых, наличием ключевых остатков в определенных положениях петель и в каркасных участках, которые определяют конформацию посредством их упаковки, водородных связей или способности принимать необычные конформации главных цепей.

Используемый в данном документе термин "CDR" или "определяющий комплементарность участок" означает несмежные сайты объединения антигенов, обнаруженные в переменном участке полипептидов как тяжелой, так и легкой цепи. Эти конкретные участки были описаны Kabat et al., J. Biol. Chem. 252, 6609-6616, 1977, by Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991, by Chothia et al., J. Mol. Biol. 196, 901-917, 1987, and by MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262, 732-745, 1996, где определения включают перекрывающиеся или подмножества аминокислотных остатков при сравнении друг с другом. Аминокислотные остатки, которые охватывают CDR, как определено в каждой из приведенных выше ссылок, приведены для сравнения. Предпочтительно, термин "CDR" представляет собой CDR, как определено Кабат на основании сравнений последовательностей.

Таблица 1

Определения CDR

	Определения CDR.		
	Кабат ¹	Хотиа(Chotia) ²	MacCallum ³
V _H CDR1	31-35	26-32	30-35
V _H CDR2	50-65	53-55	47-58
V _H CDR3	95-102	96-101	93-101
V _L CDR1	24-34	26-32	30-36
V _L CDR2	50-56	50-52	46-55
V _L CDR3	89-97	91-96	89-96

¹Нумерация остатков соответствует номенклатуре Kabat et al., выше.

²Нумерация остатков соответствует номенклатуре Chothia et al., выше.

³Нумерация остатков соответствует номенклатуре MacCallum et al., выше.

Используемый в данном документе термин "каркасный участок" или "участок FR" включает аминокислотные остатки, которые являются частью переменного участка, но не являются частью CDR (например, с использованием определения CDR по Кабат). Следовательно, каркас переменного участка имеет длину около 100-120 аминокислот, но включает только те аминокислоты, которые находятся за

пределами CDR. Для конкретного примера варибельного домена тяжелой цепи и для CDR, как определено Kabat et al., каркасный участок 1 соответствует домену варибельного участка, охватывающего аминокислоты 1-30; каркасный участок 2 соответствует домену варибельного участка, охватывающего аминокислоты 36-49; каркасный участок 3 соответствует домену варибельного участка, охватывающего аминокислоты 66-94, а каркасный участок 4 соответствует домену варибельного участка от аминокислоты 103 до конца варибельной участка. Каркасные участки для легкой цепи аналогичным образом разделены каждым из CDR варибельного участка легкой цепи. Аналогичным образом, используя определение CDR Chothia et al. или McCallum et al. границы каркасного участка разделены соответствующими концами CDR, как описано выше. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, CDR являются такими, как определено Кабат.

Во встречающихся в природе антителах шесть CDR, присутствующих на каждом мономерном антителе, представляют собой короткие несмежные последовательности аминокислот, которые специально расположены для образования антигенсвязывающего сайта, поскольку антитело приобретает трехмерную конфигурацию в водной среде. Остальная часть варибельных доменов тяжелой и легкой цепей проявляет меньшую межмолекулярную варибельность в аминокислотной последовательности и называются каркасными участками. Каркасные участки в значительной степени принимают конформацию β -листа, а CDR образуют петли, которые соединяют, а в некоторых случаях являются частью структуры β -листа. Таким образом, эти каркасные участки действуют для формирования каркаса, который обеспечивает позиционирование шести CDR в правильной ориентации посредством межцепочечных нековалентных взаимодействий. Сайт связывания антигена, образованный расположенными CDR, определяет поверхность, комплементарную эпитопу на иммунореактивном антигене. Эта комплементарная поверхность способствует нековалентному связыванию антитела с эпитопом иммунореактивного антигена. Положение CDR может быть легко идентифицировано специалистом в данной области.

Используемый в данном документе термин "фрагмент" относится к части или участку антитела или цепи антитела, содержащей меньше аминокислотных остатков, чем целое или полное антитело или цепь антитела. Термин "антигенсвязывающий фрагмент" относится к полипептидному фрагменту иммуноглобулина или антитела, которое связывает антиген или конкурирует с интактным антителом (то есть с интактным антителом, из которого они были получены) за связывание антигена (то есть специфическое связывание с TIGIT). Используемый в данном документе термин "фрагмент" молекулы антитела включает антигенсвязывающие фрагменты антител, например, варибельный домен легкой цепи антитела (VL), варибельный домен тяжелой цепи антитела (VH), одноцепочечное антитело (scFv), фрагмент F(ab')₂, фрагмент Fab, фрагмент Fd, фрагмент Fv и фрагмент однодоменного антитела (DAb). Фрагменты могут быть получены, например, посредством химической или ферментативной обработки интактного или полного антитела или цепи антитела или рекомбинантными способами.

Используемый в данном документе термин "валентность" относится к числу потенциальных сайтов связывания мишени в полипептиде. Каждый сайт связывания мишени специфически связывает одну молекулу-мишень или специфический сайт на молекуле-мишени. Когда полипептид содержит более одного сайта связывания мишени, каждый сайт связывания мишени может специфически связывать одни и те же или разные молекулы (например, может связываться с разными лигандами или разными антигенами или разными эпитопами на одном и том же антигене). Связывающие молекулы по данному изобретению имеют по меньшей мере один сайт связывания, специфичный для TIGIT.

Используемый в данном документе термин "специфичность" относится к способности связывать (например, иммунореагировать с) данную мишень, например, TIGIT. Полипептид может быть моноспецифичным и содержать один или более сайтов связывания, которые специфически связывают мишень, или полипептид может быть мультиспецифичным и содержать два или более сайтов связывания, которые специфически связывают одну и ту же или разные мишени. В одном варианте осуществления изобретения, антитело по данному изобретению является специфичным для более, чем одной мишени. Например, в одном варианте осуществления изобретения, мультиспецифичная связывающая молекула по данному изобретению связывает TIGIT и вторую молекулу-мишень. В этом контексте вторая молекула-мишень представляет собой молекулу, отличную от TIGIT.

Используемый в данном документе термин "синтетический" в отношении полипептидов включает полипептиды, которые содержат аминокислотную последовательность, которая не встречается в природе. Например, не встречающиеся в природе полипептиды, которые представляют собой модифицированные формы встречающихся в природе полипептидов (например, содержащие мутацию, такую как добавление, замещение или делеция) или которые содержат первую аминокислотную последовательность (которая может встречаться или не встречаться в природе), которая связана в линейной последовательности аминокислот со второй аминокислотной последовательностью (которая может встречаться или не встречаться в природе), с которой она не связана в природе.

Используемый в данном документе термин "сконструированный" включает манипулирование молекулами нуклеиновой кислоты или полипептида синтетическими способами (например, рекомбинантными методами, синтезом пептидов *in vitro*, ферментативным или химическим сочетанием пептидов или

некоторой комбинацией этих методов). Предпочтительно антитела по данному изобретению были сконструированы для улучшения одного или более свойств, таких как связывание антигена, стабильность/период полужизни или эффекторная функция.

Используемый в данном документе термин "модифицированное антитело" включает синтетические формы антител, которые изменены таким образом, что они не встречаются в природе, например, антитела, которые содержат по меньшей мере две части тяжелой цепи, но не две полные тяжелые цепи (такие как антитела с делецией домена или мини-тела); мультиспецифичные формы антител (например, биспецифичные, триспецифичные и т. д.), измененные для связывания с двумя или более различными антигенами или с различными эпитопами на одном антигене; молекулы тяжелых цепей, соединенные с молекулами scFv и т.п. Молекулы ScFv известны в данной области и описаны, например, в патенте США 5892019. Кроме того, термин "модифицированное антитело" включает мультвалентные формы антител (например, трехвалентные, четырехвалентные и т.д. антитела, которые связываются с тремя или более копиями одного и того же антигена). В другом варианте осуществления изобретения, модифицированное антитело по данному изобретению представляет собой слитый белок, содержащий по меньшей мере одну часть тяжелой цепи, в которой отсутствует домен CH2, и содержащую связывающую домен полипептида, содержащий связывающую часть одного члена пары рецепторных лигандов.

Термин "модифицированное антитело" может также использоваться в данном документе для обозначения вариантов аминокислотной последовательности антитела TIGIT по данному изобретению. Специалисту в данной области будет понятно, что антитело TIGIT по данному изобретению можно модифицировать для получения варианта антитела TIGIT, которое варьируется по аминокислотной последовательности по сравнению с антителом TIGIT, из которого оно было получено. Например, могут быть сделаны нуклеотидные или аминокислотные замены, приводящие к консервативным заменам или изменениям в "несущественных" аминокислотных остатках (например, в CDR и/или каркасных остатках). Аминокислотные замены могут включать замену одной или более аминокислот природной или не природной аминокислотой.

"Фрагменты антител" включают часть полноразмерного антитела, обычно его антигенсвязывающего или вариабельного домена. Примеры фрагментов антигенсвязывающих антител включают Fab, Fab', F(ab')₂, биспецифичные фрагменты Fab и Fv, диатела, линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител, вариабельный фрагмент с одной цепью (scFv) и мультиспецифичные антитела, образованные из фрагментов антител (см. Holliger and Hudson, Nature Biotechnol. 23: 1126-1136, 2005, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки).

Используемый в данном документе термин "вариант аффинности" относится к варианту антитела, которое демонстрирует одно или более изменений в аминокислотной последовательности по сравнению с эталонным антителом TIGIT по данному изобретению, причем вариант аффинности проявляет измененную аффинность к TIGIT по сравнению с эталонным антителом. Предпочтительно вариант аффинности будет проявлять улучшенную аффинность к TIGIT по сравнению с эталонным антителом TIGIT. Улучшение может проявляться в более низком KD для TIGIT или в более медленной скорости диссоциации для TIGIT. Варианты аффинности обычно демонстрируют одно или более изменений в аминокислотной последовательности в CDR по сравнению с эталонным антителом TIGIT. Такие замены могут приводить к замене исходной аминокислоты, присутствующей в данном положении в CDR, другим аминокислотным остатком, который может быть встречающимся в природе аминокислотным остатком или не встречающимся в природе аминокислотным остатком. Аминокислотные замены могут быть консервативными или неконсервативными.

Используемый в данном документе термин "аффинность" или "аффинность связывания" следует понимать исходя из обычного значения в данной области техники в контексте связывания антител, и он отражает силу и/или стабильность связывания между антигеном и сайтом связывания на антителе или его антигенсвязывающем фрагменте.

Анти-TIGIT антитела, представленные в данном документе, характеризуются высокой аффинностью связывания с TIGIT человека. Аффинность связывания к TIGIT может быть оценена с использованием стандартных методик, известных специалистам в данной области.

Аффинность связывания также может быть выражена как константа диссоциации для конкретного антитела или K_D . Чем меньше значение K_D , тем сильнее связывающее взаимодействие между антителом и его антигеном-мишенью. В одном варианте осуществления изобретения, аффинность связывания клона Fab, содержащего определенное спаривание VH/VL, можно оценивать с использованием способов, известных в данной области, например, с помощью системы ForteBio™, с помощью равновесного титрования в растворе MSD (SET), или с помощью поверхностного плазмона резонанс, например, с использованием системы Biacore™, как описано в прилагаемых примерах. Fab-фрагменты антител по данному изобретению обычно демонстрируют K_D для TIGIT, измеренную с помощью ForteBio™, в диапазоне от 1×10^{-10} до 5×10^{-8} М, необязательно от 7×10^{-10} до 4×10^{-8} М. K_D в пределах этого диапазона может быть взято как указание на то, что Fab и соответствующее двухвалентное mAb проявляют высокую аффинность связывания с hTIGIT. Бивалентные mAb, содержащие два Fab, которые (индивидуально) демонст-

рируют K_D для hTIGIT в указанных пределах, также взяты для демонстрации высокой аффинности связывания с hTIGIT. Показатель MSD K_D в диапазоне от 1×10^{-11} до 5×10^{-9} , необязательно от 2×10^{-11} до 1×10^9 , может рассматриваться как показатель высокой аффинности связывания с hTIGIT. Fab-фрагменты антител по данному изобретению обычно демонстрируют K_D для TIGIT, измеренную с помощью Biacore™, в диапазоне от 1×10^{-10} М до 1×10^{-9} М, необязательно от 1×10^{-10} до 7×10^{10} М, необязательно от 2×10^{-10} до 7×10^{10} М. K_D в пределах этого диапазона может быть взято как указание на то, что Fab и соответствующее двухвалентное мАт проявляют высокую аффинность связывания с hTIGIT.

Аффинность связывания с TIGIT человека также можно оценить с использованием системы на основе клеток, как описано в прилагаемых примерах, в которых мАт тестируют на связывание с клетками млекопитающих (клеточными линиями или клетками ex vivo, которые экспрессируют TIGIT), например, с использованием ИФА или проточной цитометрии. На высокую аффинность к TIGIT может указывать, например, EC_{50} не более 0,5 нМ с помощью метода проточной цитометрии (например, FACS), такой как описанная в примере 10. В определенных вариантах осуществления данного изобретения, антитела по данному изобретению проявляют EC_{50} клеточного связывания не более 0,5 нМ, необязательно не более, чем 0,2 нМ. Определение аффинности на основе клеток, выраженное как EC_{50} , предпочтительно определяют с использованием клеток Jurkat, экспрессирующих hTIGIT, или первичных CD8 T-клеток из мононуклеарных клеток периферической крови человека (МКПК).

Используемые в данном документе "Treg-клетки", или просто "Tregs", относятся к регуляторным CD4+ T-клеткам, то есть T-клеткам, которые снижают эффекторную функцию(и) обычных T-клеток (CD8 или CD4 T-клеток). Treg могут быть идентифицированы в соответствии со способами, известными в данной области, например, с использованием проточной цитометрии для идентификации клеток CD4, экспрессирующих высокие уровни CD25 и низкие уровни или отсутствие CD127.

Как обобщено выше, изобретение относится, по меньшей мере частично, к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с TIGIT. Свойства и характеристики антител TIGIT и фрагментов антител в соответствии с данным изобретением теперь будут описаны более подробно.

Анти-TIGIT антитела

В одном аспекте данное изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который связывается с TIGIT человека, и который содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), выбранный из последовательностей HCDR1, HCDR2 и HCDR3, продемонстрированных на фиг. 1, и который дополнительно содержит вариабельный домен легкой цепи, содержащий CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3) выбран из последовательностей LCDR1, LCDR2 и LCDR3, показанных на фиг. 2. Таким образом, изобретение относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который связывается с TIGIT человека и который содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), CDR2 тяжелой цепи (HCDR2) и CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), где:

(i) HCDR1 выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 271, 274 и 277;

(ii) HCDR2 выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41, 44, 272, 275 и 278;

(iii) HCDR3 выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 273, 276 и 279;

и который дополнительно содержит вариабельный домен легкой цепи, содержащий CDR1 легкой цепи (LCDR1), CDR2 легкой цепи (LCDR2) и CDR3 легкой цепи (LCDR3), где

(iv) LCDR1 выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 73, 76, 79, 82, 85, 88, 283, 286 и 289;

(v) LCDR2 выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 47, 50, 53, 56, 59, 62, 65, 68, 71, 74, 77, 80, 83, 86, 89, 284, 287 и 290; и

(vi) LCDR3 выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 75, 78, 81, 84, 87, 90, 285, 288 и 291.

Любое данное анти-TIGIT антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий домен VH, спаренный с доменом VL для образования сайта связывания с антигеном (TIGIT человека), будет содержать комбинацию из 6 CDR: CDR3 вариабельной тяжелой цепи (HCDR3), CDR2 вариабельной тяжелой цепи (HCDR2), CDR1 вариабельной тяжелой цепи (HCDR1), CDR3 вариабельной легкой цепи (LCDR3), CDR2 вариабельной легкой цепи (LCDR2) и CDR1 вариабельной легкой цепи (LCDR1). Хотя допустимо множество различных комбинаций из 6 CDR, выбранных из групп последовательностей CDR, перечисленных выше, и в рамках изобретения определенные комбинации из 6 CDR являются особенно предпочтительными; они представляют собой "нативные" комбинации внутри одного мАт, проявляющие высокую аффинность связывания с TIGIT человека. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат комбинацию HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, причем комбинация выбрана из группы комбинаций, образованных HCDR из

каждого антитела на фиг. 1, взятых с LCDR из соответствующего антитела на фиг. 2.

То есть в определенных вариантах осуществления данного изобретения, антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат комбинацию HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, при этом комбинация выбрана из группы, состоящей из:

(i) HCDR1, содержащего SEQ ID NO: 1, HCDR2, содержащего SEQ ID NO: 2, HCDR3, содержащего SEQ ID NO: 3, LCDR1, содержащего SEQ ID NO: 46, LCDR2, содержащего SEQ ID NO: 47, и LCDR3, содержащего SEQ ID NO: 48;

(ii) HCDR1, содержащего SEQ ID NO: 4, HCDR2, содержащего SEQ ID NO: 5, HCDR3, содержащего SEQ ID NO: 6, LCDR1, содержащего SEQ ID NO: 49, LCDR2, содержащего SEQ ID NO: 50, и LCDR3, содержащего SEQ ID NO: 51;

(iii) HCDR1, содержащего SEQ ID NO: 7, HCDR2, содержащего SEQ ID NO: 8, HCDR3, содержащего SEQ ID NO: 9, LCDR1, содержащего SEQ ID NO: 52, LCDR2, содержащего SEQ ID NO: 53, и LCDR3, содержащего SEQ ID NO: 54;

(iv) HCDR1, содержащего SEQ ID NO: 10, HCDR2, содержащего SEQ ID NO: 11, HCDR3, содержащего SEQ ID NO: 12, LCDR1, содержащего SEQ ID NO: 55, LCDR2, содержащего SEQ ID NO: 56, и LCDR3, содержащего SEQ ID NO: 57;

(v) HCDR1, содержащего SEQ ID NO: 13, HCDR2, содержащего SEQ ID NO: 14, HCDR3, содержащего SEQ ID NO: 15, LCDR1, содержащего SEQ ID NO: 58, LCDR2, содержащего SEQ ID NO: 59, и LCDR3, содержащего SEQ ID NO: 60;

(vi) HCDR1, содержащего SEQ ID NO: 16, HCDR2, содержащего SEQ ID NO: 17, HCDR3, содержащего SEQ ID NO: 18, LCDR1, содержащего SEQ ID NO: 61, LCDR2, содержащего SEQ ID NO: 62, и LCDR3, содержащего SEQ ID NO: 63;

(vii) HCDR1, содержащего SEQ ID NO: 19, HCDR2, содержащего SEQ ID NO: 20, HCDR3, содержащего SEQ ID NO: 21, LCDR1, содержащего SEQ ID NO: 64, LCDR2, содержащего SEQ ID NO: 65, и LCDR3, содержащего SEQ ID NO: 66;

(viii) HCDR1, содержащего SEQ ID NO: 22, HCDR2, содержащего SEQ ID NO: 23, HCDR3, содержащего SEQ ID NO: 24, LCDR1, содержащего SEQ ID NO: 67, LCDR2, содержащего SEQ ID NO: 68, и LCDR3, содержащего SEQ ID NO: 69;

(ix) HCDR1, содержащего SEQ ID NO: 25, HCDR2, содержащего SEQ ID NO: 26, HCDR3, содержащего SEQ ID NO: 27, LCDR1, содержащего SEQ ID NO: 70, LCDR2, содержащего SEQ ID NO: 71, и LCDR3, содержащего SEQ ID NO: 72;

(x) HCDR1, содержащего SEQ ID NO: 28, HCDR2, содержащего SEQ ID NO: 29, HCDR3, содержащего SEQ ID NO: 30, LCDR1, содержащего SEQ ID NO: 73, LCDR2, содержащего SEQ ID NO: 74, и LCDR3, содержащего SEQ ID NO: 75;

(xi) HCDR1, содержащего SEQ ID NO: 31, HCDR2, содержащего SEQ ID NO: 32, HCDR3, содержащего SEQ ID NO: 33, LCDR1, содержащего SEQ ID NO: 76, LCDR2, содержащего SEQ ID NO: 77, и LCDR3, содержащего SEQ ID NO: 78;

(xii) HCDR1, содержащего SEQ ID NO: 34, HCDR2, содержащего SEQ ID NO: 35, HCDR3, содержащего SEQ ID NO: 36, LCDR1, содержащего SEQ ID NO: 79, LCDR2, содержащего SEQ ID NO: 80, и LCDR3, содержащего SEQ ID NO: 81;

(xiii) HCDR1, содержащего SEQ ID NO: 37, HCDR2, содержащего SEQ ID NO: 38, HCDR3, содержащего SEQ ID NO: 39, LCDR1, содержащего SEQ ID NO: 82, LCDR2, содержащего SEQ ID NO: 83, и LCDR3, содержащего SEQ ID NO: 84;

(xiv) HCDR1, содержащего SEQ ID NO: 40, HCDR2, содержащего SEQ ID NO: 41, HCDR3, содержащего SEQ ID NO: 42, LCDR1, содержащего SEQ ID NO: 85, LCDR2, содержащего SEQ ID NO: 86, и LCDR3, содержащего SEQ ID NO: 87;

(xv) HCDR1, содержащего SEQ ID NO: 43, HCDR2, содержащего SEQ ID NO: 44, HCDR3, содержащего SEQ ID NO: 45, LCDR1, содержащего SEQ ID NO: 88, LCDR2, содержащего SEQ ID NO: 89, и LCDR3, содержащего SEQ ID NO: 90;

(xvi) HCDR1, содержащего SEQ ID NO: 271, HCDR2, содержащего SEQ ID NO: 272, HCDR3, содержащего SEQ ID NO: 273, LCDR1, содержащего SEQ ID NO: 283, LCDR2, содержащего SEQ ID NO: 284, и LCDR3, содержащего SEQ ID NO: 285;

(xvii) HCDR1, содержащего SEQ ID NO: 274, HCDR2, содержащего SEQ ID NO: 275, HCDR3, содержащего SEQ ID NO: 276, LCDR1, содержащего SEQ ID NO: 286, LCDR2, содержащего SEQ ID NO: 287, и LCDR3, содержащего SEQ ID NO: 288;

(xviii) HCDR1, содержащего SEQ ID NO: 277, HCDR2, содержащего SEQ ID NO: 278, HCDR3, содержащего SEQ ID NO: 279, LCDR1, содержащего SEQ ID NO: 289, LCDR2, содержащего SEQ ID NO: 290, и LCDR3, содержащего SEQ ID NO: 291.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат переменный домен тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 211, 213, 215, 217, 219, 221, 223, 225, 227, 229, 231, 233, 235, 237, 239, 327, 329 и 331 и аминокислотных последовательностей, демонстрирующих по мень-

шей мере 90, 95, 97, 98 или 99% идентичности последовательности к ним; и необязательно содержат вариабельный домен легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 212, 214, 216, 218, 220, 222, 224, 226, 228, 230, 232, 234, 236, 238, 240, 328, 330 и 332 и аминокислотных последовательностей, имеющих по меньшей мере 90, 95, 97, 98 или 99% идентичности последовательности с ней.

Хотя все возможные пары VH-доменов и VL-доменов, выбранных из групп последовательностей доменов VH и VL, перечисленных выше, являются допустимыми, и в рамках изобретения определенные комбинации VH и VL являются особенно предпочтительными; они представляют собой "нативные" комбинации внутри одного мАт, проявляющие высокую аффинность связывания с TIGIT человека.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат комбинацию вариабельного домена тяжелой цепи и вариабельного домена легкой цепи, причем комбинация выбрана из группы комбинаций, образованных VH из каждого антитела на фиг. 5, или аминокислотную последовательность, демонстрирующую по меньшей мере 90, 95, 97, 98 или 99% идентичности последовательности, взятой с VL из того же антитела на фиг. 5, или аминокислотную последовательность, демонстрирующую по меньшей мере 90, 95, 97, 98 или 99% идентичности последовательности. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат комбинацию вариабельного домена тяжелой цепи и вариабельного домена легкой цепи, при этом комбинация выбрана из группы, состоящей из:

(i) вариабельного домена тяжелой цепи, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 211, и вариабельного домена легкой цепи, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 212;

(ii) вариабельного домена тяжелой цепи, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 213, и вариабельного домена легкой цепи, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 214;

(iii) вариабельного домена тяжелой цепи, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 215, и вариабельного домена легкой цепи, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 216;

(iv) вариабельного домена тяжелой цепи, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 217, и вариабельного домена легкой цепи, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 218;

(v) вариабельного домена тяжелой цепи, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 219, и вариабельного домена легкой цепи, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 220;

(vi) вариабельного домена тяжелой цепи, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 221, и вариабельного домена легкой цепи, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 222;

(vii) вариабельного домена тяжелой цепи, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 223, и вариабельного домена легкой цепи, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 224;

(viii) вариабельного домена тяжелой цепи, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 225, и вариабельного домена легкой цепи, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 226;

(ix) вариабельного домена тяжелой цепи, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 227, и вариабельного домена легкой цепи, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 228;

(x) вариабельного домена тяжелой цепи, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 229, и вариабельного домена легкой цепи, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 230;

(xi) вариабельного домена тяжелой цепи, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 231, и вариабельного домена легкой цепи, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 232;

(xii) вариабельного домена тяжелой цепи, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 233, и вариабельного домена легкой цепи, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 234;

(xiii) вариабельного домена тяжелой цепи, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 235, и вариабельного домена легкой цепи, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 236;

(xiv) вариабельного домена тяжелой цепи, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 237, и вариабельного домена легкой цепи, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 238;

(xv) вариабельного домена тяжелой цепи, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 239, и вариабельного домена легкой цепи, содержащего аминокислотную последовательность

SEQ ID NO: 240;

(xvi) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 327 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную ей, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 328, или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную ей;

(xvii) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 329 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную ей, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 330, или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную ей; и

(xviii) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 331 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную ей, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 332, или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную ей.

Для каждой из конкретных комбинаций VH/VL, перечисленных выше, также допустимо и в рамках изобретения, комбинировать домен VH, имеющий аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90, 92, 95, 97 или 99% идентичную указанной последовательности домена VH с доменом VL, имеющим аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90, 92, 95, 97 или 99% идентичную последовательности перечисленного домена VL. Варианты осуществления изобретения, в которых аминокислотная последовательность домена VH демонстрирует менее чем 100% идентичность последовательности с данной эталонной последовательностью VH, тем не менее, может содержать CDR тяжелой цепи, которые идентичны HCDR1, HCDR2 и HCDR3 эталонной последовательности, хотя демонстрируют вариацию аминокислотной последовательности в пределах участков рамки. Аналогично, варианты осуществления изобретения, в которых аминокислотная последовательность домена VL демонстрирует менее чем 100% идентичность последовательности с данной эталонной последовательностью, тем не менее, может содержать CDR легкой цепи, которые идентичны LCDR1, LCDR2 и LCDR3 эталонной последовательности, хотя демонстрируют вариацию аминокислотной последовательности в пределах участков рамки.

В предыдущем параграфе и в других местах данного описания структура анти-тел/антигенсвязывающих фрагментов определяется на основе % идентичности последовательности с указанной эталонной последовательностью (с заданной SEQ ID NO). В этом контексте, % идентичности последовательностей между двумя аминокислотными последовательностями можно определить путем сравнения этих двух последовательностей, выровненных оптимальным образом, и в которых сравниваемая аминокислотная последовательность может содержать добавления или делеции относительно контрольной последовательности для оптимального выравнивания между этими двумя последовательностями. Процент идентичности рассчитывается путем определения количества идентичных положений, для которых аминокислотный остаток является идентичным между двумя последовательностями, путем деления этого числа идентичных положений на общее количество положений в окне сравнения и умножения полученного результата на 100, чтобы получить процент идентичности между этими двумя последовательностями. Обычно окна сравнения соответствуют полной длине сравниваемой последовательности. Например, можно использовать программу BLAST "BLAST 2 sequences" (Tatusova et al, "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol Lett. 174: 247-250), доступную на сайте <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>, параметры используются по умолчанию (в частности, для параметров "штраф за открытый разрыв": 5, и "штраф за разрыв расширения": 2; выбранная матрица, например, матрица "BLOSUM 62", предложенная программой), процент идентичности между двумя последовательностями, подлежащими сравнению, рассчитывается непосредственно программой. Определение идентичности последовательности запросов последовательности к эталонной последовательности находится в пределах компетенции специалиста в данной области и могут быть выполнены с использованием коммерчески доступного программного обеспечения для анализа, такого как BLAST™.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут содержать вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи, при этом HCDR1 содержит SEQ ID NO: 16, HCDR2 содержит SEQ ID NO: 17, HCDR3 содержит SEQ ID NO: 18, и LCDR1 содержит SEQ ID NO: 61, LCDR2 содержит SEQ ID NO: 62, и LCDR3 содержит SEQ ID NO: 63.

В некоторых таких вариантах осуществления данного изобретения, вариабельный домен тяжелой цепи может содержать аминокислотную последовательность, показанную как SEQ ID NO: 221, или аминокислотную последовательность, проявляющую идентичность последовательности по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99%, и вариабельный домен легкой цепи может содержать аминокислотную последовательность, показанную как SEQ ID NO: 222 или аминокислотной последовательностью, проявляющей по меньшей мере 90, 95, 97, 98 или 99% идентичности последовательности с ней. В некоторых таких вариантах осуществления данного изобретения, вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи представляют собой домен VH и VL антитела 31282, представленного в данном документе.

Антитело 31282, представленное в данном документе, происходит от антитела 29489. Антитело 31282 было получено из 29489 путем замены М-Т на аминокислоту 116 в участке FR4 VH. Понятно, что эта замена удаляет потенциальный сайт окисления антитела и, таким образом, улучшает стабильность, не влияя на функцию. Таким образом, антитела 31282 и 29489 имеют идентичные последовательности HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, отличающиеся только каркасом.

Соответственно, в определенных вариантах осуществления антител или антигенсвязывающих фрагментов по данному изобретению, переменный домен тяжелой цепи может содержать аминокислотную последовательность, показанную как SEQ ID NO: 219, или аминокислотную последовательность, проявляющую идентичность последовательности по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99%, и переменный домен легкой цепи может содержать аминокислотную последовательность, показанную как SEQ ID NO: 220, или аминокислотную последовательность, проявляющую по меньшей мере 90, 95, 97, 98 или 99% идентичности последовательности с ней. В некоторых таких вариантах осуществления данного изобретения, переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи представляют собой домен VH и VL антитела 29489, представленного в данном документе.

Варианты осуществления изобретения, в которых аминокислотная последовательность домена VH демонстрирует менее чем 100% идентичность последовательности с последовательностью, показанной как SEQ ID NO: 221 или 219, тем не менее, может содержать CDR тяжелой цепи, которые идентичны HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 221 и 219 (SEQ ID NO: 16, 17 и 18 соответственно), хотя демонстрируют вариацию аминокислотной последовательности в каркасных участках. Аналогично, варианты осуществления изобретения, в которых аминокислотная последовательность домена VL проявляет менее чем 100% идентичность последовательности с последовательностью, показанной как SEQ ID NO: 222 или 220, тем не менее, может содержать CDR легкой цепи, которые идентичны LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 222 и 220 (SEQ ID NO: 61, 62 и 63 соответственно), в то же время демонстрируя вариацию аминокислотной последовательности в каркасных участках.

Иллюстративные антитела к TIGIT, описанные в данном документе и имеющие последовательности, представленные на фиг. 1-5, были получены из 5 клонов родительских антител. Табл. 2 суммирует родословную антител, описанных в данном документе. Наивные родительские человеческие анти-TIGIT-антитела были экспрессированы в дрожжах, и были отобраны те, которые проявляют высокую функциональную активность против TIGIT (серые строки, названные 26 ...), и подвергались созреванию аффинности. Отобранные аффинно-зрелые антитела затем экспрессировали в клетках млекопитающих (белые ряды под каждым родительским, названные 29... или 3...). Кроме того, антитело 31282 было получено из 29489 путем замены М-Т на аминокислоту 116 в участке FR4 VH. Понятно, что эта замена удаляет потенциальный сайт окисления антитела и, таким образом, улучшает стабильность, не влияя на функцию. Кроме того, антитело 31288 было получено из 29494 путем замены V-L на аминокислоту 2 в участке FR1 VH и путем замены М-Т на аминокислоту 120 в участке FR4 VH. Предполагается, что замена V-L восстанавливает последовательность зародышевой линии VH4-39 и замену М-Т, чтобы удалить потенциальный сайт окисления антитела и тем самым улучшить стабильность, не влияя на функцию.

Таблица 2

Клон антитела	CDR3 VH клеточной линии	Метод оптимизации	VH зародышевой линии
26518	26518	Родительский	VH3-07
29478	26518	H1/H2/H3	VH3-30
26452	26452	Родительский	VH1-46
29487	26452	H1/H2/H3	VH1-46
29489	26452	H1/H2/H3	VH1-46
31282	29489	Аминокислотная мутация M116T	VH1-46
26486	26486	Родительский	VH4-0B
29499	26486	H1/H2/H3	VH4-39
29494	26486	H1/H2/H3	VH4-39
31288	29494	Реверсия зародышевой линии + аминокислотная мутация M116T	VH4-39
32919	31288	L1/L2/L3	VH4-39
32931	31288	L1/L2/L3	VH4-39
26521	26521	Родительская	VH1-69
29513	26521	H1/H2/H3	VH1-69
26493	26493	Родительская	VH3-09
29520	26493	H1/H2/H3	VH3-09
29523	26493	H1/H2/H3	VH3-33
29527	26493	H1/H2/H3	VH3-30
26432	26432	Родительский	VH1-69
32959	26432	H1/H2/H3	VH1-69

Антитела второго поколения проявляют более высокую аффинность, чем соответствующие родительские антитела.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к анти-TIGIT антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, причем домен VH получен из последовательности V-участка зародышевой линии человека, выбранного из: VH3-07, VH3-30, VH1-46, VH4-0B, VH4-39, VH1-69, VH3-09, VH3-33, VH3-30. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит домен VH, полученный из V-участка зародышевой линии человека VH1-46.

Домен VH "получен из" определенного V-участка последовательности зародышевой линии, если последовательность переменного участка тяжелой цепи более вероятно получена из данной зародышевой линии, чем из любой другой.

Эпитоп TIGIT

Изобретение также относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который связывается с TIGIT человека в эпитопе, содержащем остатки Q56 и I109. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают TIGIT человека по меньшей мере на остатках Q56, N58 и I109. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают TIGIT человека с эпитопом, содержащем остатки Q56, N58 и I109 и, необязательно, один или более остатков E60, I68, L73 и H76. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывают TIGIT человека с эпитопом, содержащим остатки Q56, N58, E60, I68, L73, H76 и I109.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с TIGIT человека в эпитопе, состоящем из остатков TIGIT Q56, N58, E60, I68, L73, H76 и I109. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывает тот же эпитоп, что и антитело 31282.

Когда антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывают эпитоп TIGIT человека, содержащий указанные остатки TIGIT, антитело связывает каждый из этих остатков и, необязательно, другие остатки TIGIT. Когда антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывают эпитоп TIGIT человека, состоящий из остатков TIGIT Q56, N58, E60, I68, L73, H76 и I109, антитело связывает каждый из этих остатков и никаких других остатков TIGIT.

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается с TIGIT человека по данному эпитопу, если он связывается с указанным аминокислотным остатком(ами) TIGIT при связывании с TIGIT. Как используется в данном документе, антитело связывается с остатком TIGIT, если, находясь в белковом комплексе, образованном связыванием антитело-TIGIT, остаток соответствует каждому из следующих критериев: (i) он имеет рассчитанный вклад свободной энергии связывания, превышающий 0,3

ккал/моль, (ii) он имеет экспериментальный усредненный В-фактор ниже, чем средний В-фактор всех остатков в рентгеновской структуре, (iii) он создает по меньшей мере 3 пары межатомных контактов тяжелых атомов с атомами антител на расстоянии менее чем или равно 4,0 Ангстрем, (iv) он не образует только водородную связь или ионные взаимодействия, подверженные воздействию растворителя, (v) если это неароматический полярный остаток (Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, или Arg), он осуществляет по меньшей мере одну водородную связь или ионное взаимодействие с антителом. Расчет свободной энергии связывания будет в пределах возможностей квалифицированного специалиста. Предпочтительно свободная энергия связывания рассчитывается с использованием эмпирического силового поля, предпочтительно FoldX. FoldX был бы знаком специалисту и общедоступен по адресу <http://foldxsuite.crg.eu/>. Расчет свободной энергии связывания с использованием FoldX также описан в Guerois et al. J. Mol. Biol. 2002; 320 (2): 369-87, который включен в данный документ посредством ссылки. Специалисту в данной области техники известно, что все тяжелые атомы представляют собой неводородные атомы (включая C, N, O, S).

Соответственно, изобретение также относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который связывается с TIGIT человека по меньшей мере на остатках Q56 и I109. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент контактирует с TIGIT человека по меньшей мере на остатках Q56, N58 и I109. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с TIGIT человека по меньшей мере на остатках Q56, N58 и I109, и, необязательно, на одном или более из остатков E60, I68, L73 и H76. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент контактирует с TIGIT человека по меньшей мере на остатках Q56, N58, E60, I68, L73, H76, и I109.

В некоторых таких вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с TIGIT человека только на остатках Q56, N58, E60, I68, L73, H76 и I109.

Средства для определения того, какие остатки TIGIT связываются с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, знакомы специалисту в данной области техники, включая рентгеновскую кристаллографию, такую, как описанная в примере 23.

Также предоставляется выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с тем же эпитопом, что и антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе.

Подтипы антитела

Антитела TIGIT могут иметь различные варианты осуществления, в которых присутствуют как домен VH, так и домен VL. Термин "антитело" в данном документе используется в самом широком смысле и охватывает, но не ограничивается ими, моноклональные антитела (включая моноклональные антитела полной длины), поликлональные антитела, полиспецифичные антитела (например, биспецифичные антитела), при условии, что они демонстрируют соответствующую иммунологическую специфичность человеческого белка TIGIT. Используемый в данном документе термин "моноклональное антитело" относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными и направлены против одного антигенного сайта. Кроме того, в отличие от обычных (поликлональных) препаратов антител, которые обычно включают разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов) на антигене, каждое моноклональное антитело направлено против одной детерминанты или эпитопа на антигене.

В неограничивающих вариантах осуществления данного изобретения, антитела TIGIT, представленные в данном документе, могут содержать домены CH1 и/или домены CL, аминокислотная последовательность которых полностью или практически человеческая. Если антитело TIGIT предназначено для терапевтического применения у человека, типично, что весь константный участок антитела или по меньшей мере его часть, имеют полностью или практически человеческую аминокислотную последовательность. Следовательно, одна или более или любая комбинация домена CH1, шарнирного участка, домена CH2, домена CH3 и домена CL (и домена CH4, если присутствует) может быть полностью или практически человеческой в отношении его аминокислотной последовательности. Такие антитела могут иметь любой человеческий изотип, причем человеческие IgG4 и IgG1 являются особенно предпочтительными.

Преимущественно, домен CH1, шарнирный участок, домен CH2, домен CH3 и домен CL (и домен CH4, если присутствует) могут все иметь полностью или практически человеческую аминокислотную последовательность. В контексте константного участка гуманизованного или химерного антитела или фрагмента антитела термин "по существу человеческий" относится к идентичности аминокислотной последовательности по меньшей мере на 90%, или по меньшей мере на 92%, или по меньшей мере на 95%, или по меньшей мере 97% или по меньшей мере на 99% с человеческим константным участком. Термин "аминокислотная последовательность человека" в данном контексте относится к аминокислотной последовательности, которая кодируется геном иммуноглобулина человека, который включает зародышевые,

перестроенные и соматически мутированные гены. Такие антитела могут иметь любой человеческий изотип, причем человеческие IgG4 и IgG1 являются особенно предпочтительными.

Также предоставлены антитела TIGIT, содержащие константные домены "человеческой" последовательности, которые были изменены одной или более аминокислотными добавками, делециями или заменами по отношению к человеческой последовательности.

Антитела TIGIT, представленные в данном документе, могут иметь любой изотип. Антитела, предназначенные для терапевтического применения у людей, обычно имеют тип IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, часто тип IgG, и в этом случае они могут принадлежать к любому из четырех подклассов IgG1, IgG2a и b, IgG3 или IgG4. Внутри каждого из этих подклассов разрешается делать одну или более аминокислотных замен, вставок или делеций в пределах Fc-части или делать другие структурные модификации, например, для усиления или уменьшения Fc-зависимых функциональностей.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, антитела TIGIT, представленные в данном документе, представляют собой антитела IgG. В определенных вариантах осуществления данного изобретения, антитела по данному изобретению представляют собой антитела IgG1. В некоторых альтернативных вариантах осуществления данного изобретения, антитела по данному изобретению представляют собой антитела IgG4.

Известно, что антитела IgG4 подвергаются обмену Fab плеча (FAE), что может привести к непредсказуемым фармакодинамическим свойствам антитела IgG4. Было продемонстрировано, что FAE предотвращается мутацией S228P в шарнирном участке (Silva et al. J Biol Chem. 2015 Feb 27; 290(9): 5462-5469). Следовательно, в некоторых таких вариантах осуществления данного изобретения, в которых антитело по данному изобретению представляет собой антитело IgG4, антитело содержит мутацию S228P, то есть мутацию серина в пролин в положении 228 (согласно нумерации ЕС).

В неограничивающих вариантах осуществления данного изобретения, предполагается, что одна или более аминокислотных замен, вставок или делеций могут быть сделаны в константном участке тяжелой и/или легкой цепи, особенно в участке Fc. Аминокислотные замены могут привести к замене замещенной аминокислоты другой встречающейся в природе аминокислотой или не встречающейся в природе или модифицированной аминокислотой. Также допускаются другие структурные модификации, такие как, например, изменения в паттерне гликозилирования (например, путем добавления или удаления N- или O-связанных сайтов гликозилирования). В зависимости от предполагаемого использования антитела TIGIT может быть желательно модифицировать антитело по данному изобретению в отношении его свойств связывания с рецепторами Fc, например, для модуляции эффекторной функции.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитела TIGIT могут содержать Fc-участок данного изотипа антитела, например, человеческого IgG1, который модифицирован для уменьшения или существенного устранения одной или более эффекторных функций антитела, природно связанных с этим изотипом антитела.

Как продемонстрировано в данном документе, антитела с литическими эффекторными функциями клеток могут быть эффективными в уменьшении популяций Treg-клеток, но, к удивлению, без неблагоприятного воздействия на обычные популяции эффекторных T-клеток. Эта селективность может позволить более сильное ингибирование регуляторного эффекта Treg при сохранении противоопухолевых эффекторных T-клеток.

Следовательно, в некоторых альтернативных вариантах осуществления данного изобретения, антитела TIGIT сохраняют одну или более эффекторных функций антитела, природно связанных с этим изотипом антитела. Например, антитела TIGIT по данному изобретению могут быть антителами IgG1, которые сохраняют функциональность АЗКЦ. В других вариантах осуществления данного изобретения, антитела TIGIT могут содержать Fc-участок данного изотипа антитела, например, человеческого IgG1, который модифицирован для усиления одной или более эффекторных функций антитела, природно связанных с этим изотипом антитела. В этом контексте "эффекторные функции антител" включают одно или более или все антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ), комплементзависимую цитотоксичность (CDC) и антителозависимый клеточный фагоцитоз (АЗКФ).

В определенных вариантах осуществления данного изобретения, анти-TIGIT антитело представляет собой модифицированное антитело.

В определенных вариантах осуществления данного изобретения, обеспечивается биспецифичное антитело, содержащее первое плечо, специфичное для TIGIT, и второе плечо, специфичное для второй мишени. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, вторая мишень представляет собой молекулу иммунной контрольной точки. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, вторая мишень представляет собой OX40. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, вторая мишень представляет собой ICOS. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, вторая мишень представляет собой GITR. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, вторая мишень представляет собой 4-1BB. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, вторая мишень представляет собой PD-1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, вторая мишень представляет собой PD-L1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, первое плечо, специфичное для TIGIT содержит комбинацию последовательностей HCDR1,

HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 антитела согласно данному изобретению. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, первое плечо содержит переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, при этом HCDR1 содержит SEQ ID NO: 16, HCDR2 содержит SEQ ID NO: 17, HCDR3 содержит SEQ ID NO: 18, и LCDR1 содержит SEQ ID NO: 61, LCDR2 содержит SEQ ID NO: 62, и LCDR3 содержит SEQ ID NO: 63.

Моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые "перекрестно конкурируют" с антителами TIGIT, описанными в данном документе, представляют собой антитела, которые связывают TIGIT человека в сайте(ах), которые идентичны или перекрываются с сайт(ами), в которых присутствующие TIGIT антитела связываются. Конкурирующие моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть идентифицированы, например, с помощью анализа конкуренции антител. Например, образец очищенного или частично очищенного TIGIT человека может быть связан с твердой подложкой. Затем добавляют соединение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по данному изобретению или моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предположительно способные конкурировать с таким соединением антитела по данному изобретению. Одна из двух молекул помечена. Если помеченное соединение и немеченое соединение связываются с отдельными и дискретными сайтами на TIGIT, то помеченное соединение будет связываться до одного и того же уровня, независимо от того, присутствует ли предполагаемое конкурирующее соединение или нет. Однако, если сайты взаимодействия идентичны или перекрываются, то немеченое соединение будет конкурировать, и количество меченого соединения, связанного с антигеном, будет снижено. Если немеченое соединение присутствует в избытке, то очень мало, если таковое имеется, меченого соединения будет связываться.

Для целей данного изобретения конкурирующие моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты представляют собой такие, которые уменьшают связывание соединений данного антитела с TIGIT на около 50, около 60, около 70, около 80, около 85, около 90, около 95 или около 99%. Детали процедур для проведения таких конкурентных анализов хорошо известны в данной области и могут быть найдены, например, в Harlow and Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1988, 567-569, 1988, ISBN 0-87969-314-2. Такие анализы могут быть сделаны количественно с использованием очищенных антител. Стандартная кривая устанавливается путем титрования одного антитела против самого себя, т.е. одно и то же антитело используется как для метки, так и для конкурента. Способность немеченого конкурирующего моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента ингибировать связывание меченой молекулы с планшетом титруется. Результаты наносят на график и сравнивают концентрации, необходимые для достижения желаемой степени ингибирования связывания.

Антитела изобретения демонстрируют высокую аффинность для TIGIT и конкуренции с CD155

В определенных вариантах осуществления данного изобретения, антитела или антигенсвязывающие фрагменты по данному изобретению проявляют высокую аффинность к TIGIT человека. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, Fab-фрагменты антител согласно данному изобретению демонстрируют K_D для TIGIT, измеренную с помощью ForteBio™ в диапазоне от 1×10^{-10} до 5×10^{-8} М, необязательно от 7×10^{-10} до 4×10^{-8} М. В некоторых вариантах осуществления антитела по данному изобретению проявляют MSD K_D в диапазоне от 1×10^{-11} до 5×10^{-9} М, необязательно от 2×10^{-11} до 1×10^{-9} . В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, Fab-фрагменты антител согласно данному изобретению демонстрируют K_D для TIGIT, измеренную Biacore™, в диапазоне от 1×10^{-10} М до 1×10^{-9} М, необязательно от 1×10^{-10} до 7×10^{-10} М, необязательно от 2×10^{-10} до 7×10^{-10} М.

Таблица 3

Клон	ForteBio Fab KD биотини лированно го человечес кого TIGIT HIS (M) одновалент ный	ForteBio Fab KD мышинно го TIGIT- Fc (M) одновалент ный	ForteBio Fab KD Суно TIGIT-Fc (M) одновалент ный	ForteBio IgG KD человеч еского TIGIT- Fc (M) Avid	MSD - KD одновале нтного (M), человечес кого TIGIT- His	Biacore - KD однова лентного (M), человечес кого TIGIT- His	Связыва ние клеток Jurkat человечес ким TIGIT FON (Кратно сть по сравнению с отрицате льным контро лем)	Связыва ние клеток Jurkat мышинным TIGIT FON (Кратно сть по сравнению с отрицате льным контро лем)
2651 8	1.24E-09	N.B.	4.47E-09	6.30E-10			154	233
2947 8	7.03E-10	9.18E-08	1.26E-09	5.27E-10			182	500
2645 2	5.08E-09	N.B.	N.B.	4.74E-10			164	47
2948 7	2.08E-09	N.B.	1.55E-07	3.96E-10			161	95
2948 9	8.81E-10	N.B.	3.52E-08	3.53E-10	1.1E-10	2.48E- 10	162	187
3128 2	1.34E-09	N.B.	3.77E-08			2.94E- 10		
2648 6	2.19E-08	N.B.	N.B.	5.89E-10			143	199
2949 9	1.66E-09	2.55E-08	1.45E-08	3.19E-10	1.9E-11		164	541
2949 4	1.66E-09	5.36E-08	1.86E-08	3.76E-10	7.0E-11	2.70E- 10	164	511
3128 8	2.09E-09		2.51E-08			1.92E- 10		

32919	1.42E-09		6.57E-09				680	
32931	1.18E-09		1.97E-09				741	
29499	1.66E-09	2.55E-08	1.45E-08	3.19E-10	1.9E-11		164	541
26521	9.87E-09	N.B.	1.49E-07	5.41E-10			146	218
29513	7.74E-10	8.55E-08	9.56E-09	3.92E-10	2.5E-11		156	406
26493	4.06E-08	2.67E-08	N.B.	1.49E-09			80	463
29520	1.31E-09	1.95E-09	2.68E-09	3.84E-10	2.1E-10	7.16E-10	166	535
29523	3.84E-09	1.89E-08	2.79E-08	5.31E-10	1.7E-09		150	502
29527	1.33E-09	2.02E-08	1.76E-08	3.50E-10	6.4E-10		142	414
26432	1.31E-08	N.B.	N.B.	4.62E-09				

Как продемонстрировано в примерах, антитело 31282 проявляет удивительно высокую аффинность к TIGIT, экспрессированному на трансгенных клетках. Соответственно, в определенных вариантах осуществления данного изобретения, анти-TIGIT антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, демонстрируют связывание EC_{50} для TIGIT человека менее чем 0,5 нМ. В таких предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, антитело или антигенсвязывающий фрагмент проявляют связывающую EC_{50} от около 0,05 до около 0,4 нМ, предпочтительно от около 0,05 до около 0,3 нМ, предпочтительно от около 0,05 до около 0,2 нМ, предпочтительно от около 0,05 до около 0,15 нМ. В определенных предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, антитело или антигенсвязывающий фрагмент демонстрируют связывание EC_{50} для TIGIT человека около 0,1 нМ. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, антитело содержит CDR антитела 31282. Предпочтительно EC_{50} определяют с использованием клеток Jurkat, экспрессирующих TIGIT человека, как описано в примере 18. В определенных вариантах осуществления данного изобретения, антитела или антигенсвязывающие фрагменты по данному изобретению перекрестно реагируют с TIGIT мыши и/или TIGIT яванца.

Поскольку "29 ..." антитела второго поколения являются потомством аффинно-зрелых высокофункциональных родительских антител, ожидается, что они будут проявлять по меньшей мере такие же или эквивалентные функциональные свойства, как у родительских антител, и наоборот.

Как описано в данном документе, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или антигенсвязывающий фрагмент по данному изобретению имеет эквивалентную аффинность к TIGIT, экспрессируемому CD8 Т-клетками и экспрессируемому Treg-клетками. Как используется в данном документе, антитело или антигенсвязывающий фрагмент имеет "эквивалентную аффинность" для CD8 Т-клеток и Treg-клеток, если аффинность для CD8 Т-клеток находится в диапазоне от 0,5 до 1,5 от аффинности для Treg-клеток. Например, антитело, имеющее эквивалентную аффинность к CD8 Т-клеткам и Treg-клеткам, которое проявляет аффинность к Treg-клеткам 0,03 нМ, будет проявлять аффинность к CD8 Т-клеткам в диапазоне 0,015-0,045 нМ.

В табл. 3 представлена сводная информация об аффинных свойствах анти-TIGIT антител по данному изобретению, где серые клетки указывают на клоны родительских антител, а антитела второго и третьего поколений каждой клеточной линии продемонстрированы непосредственно под соответствующим родительским антителом (см. также табл. 2).

Как продемонстрировано в примерах, антитело 31282 проявляет удивительно высокую аффинность к TIGIT, экспрессированному на первичных CD8+ Т-клетках человека. Соответственно, в определенных вариантах осуществления данного изобретения, анти-TIGIT антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, демонстрируют связывание EC_{50} для TIGIT человека менее чем 0,5 нМ. В таких предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, антитело или антигенсвязывающий фрагмент проявляют связывающую EC_{50} от около 0,05 до около 0,4 нМ, предпочтительно от около 0,1 до около 0,3 нМ. В определенных предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, антитело или антигенсвязывающий фрагмент демонстрируют связывание EC_{50} для TIGIT человека около 0,2 нМ. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, ан-

титело или антигенсвязывающий фрагмент содержат CDR антитела 31282. Предпочтительно EC_{50} определяют с использованием $CD8^+$ Т-клеток из МКПК человека, предпочтительно от здорового человека, как описано в Примере 18.

Как продемонстрировано в прилагаемых примерах, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитела или антигенсвязывающий фрагмент по данному изобретению проявляют высокую аффинность к TIGIT-экспрессирующим $CD8$ Т-клеткам и высокую аффинность к TIGIT-экспрессирующим Treg-клеткам. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитела или антигенсвязывающий фрагмент по данному изобретению проявляют аффинность к TIGIT-экспрессирующим $CD8$ Т-клеткам и TIGIT-экспрессирующим Treg-клеткам, характеризующимся EC_{50} менее чем 0,5 нМ, предпочтительно менее чем 0,3 нМ, предпочтительно менее чем 0,2 нМ. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитела или антигенсвязывающий фрагмент по данному изобретению проявляют эквивалентную аффинность в отношении TIGIT-экспрессирующих $CD8$ Т-клеток и в отношении TIGIT-экспрессирующих Treg-клеток.

Антитела по данному изобретению (например, антитело 31282) проявляют удивительно высокую аффинность к $CD8^+$ Т-клеткам от больных раком пациентов. Это особенно выгодно, поскольку повышение эффекторной активности Т-клеток у онкологических больных путем ингибирования передачи сигналов TIGIT может привести к более эффективному контролю опухоли. Соответственно, в определенных вариантах осуществления данного изобретения, анти-TIGIT антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, демонстрируют связывание EC_{50} менее чем 0,5 нМ для TIGIT человека на $CD8^+$ Т-клетках человека от больных раком пациентов. В таких предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, антитело или антигенсвязывающий фрагмент проявляют связывающую EC_{50} от около 0,05 до около 0,4 нМ, предпочтительно от около 0,1 до около 0,3 нМ. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, антитело или антигенсвязывающий фрагмент проявляют EC_{50} для TIGIT человека от около 0,1 до около 0,2 нМ. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат CDR антитела 31282. Предпочтительно EC_{50} определяют с использованием $CD8^+$ Т-клеток из МКПК, взятых у пациента больного раком, как описано в примере 18.

Как продемонстрировано в прилагаемых примерах, в определенных вариантах осуществления данного изобретения, антитела или антигенсвязывающие фрагменты по данному изобретению конкурируют с $CD155/PVR$ за связывание TIGIT. В определенных вариантах осуществления данного изобретения, антитело или антигенсвязывающий фрагмент по данному изобретению проявляет конкуренцию с $CD155$, характеризующимся IC_{50} 0,2 нМ или менее, предпочтительно 0,1 нМ или менее. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или антигенсвязывающий фрагмент проявляют конкуренцию с $CD155$, характеризующимся IC_{50} около 0,05 нМ или менее. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, IC_{50} составляет около 0,05 нМ. Не желая быть связанными какой-либо теорией, конкуренция антител с $CD155$ за связывание TIGIT, как ожидается, снизит уровни $CD155$ -индуцированной передачи сигналов TIGIT, тем самым увеличивая уровни активации эффекторных Т-клеток.

Изобретение, кроме того, предоставляет "варианты аффинности" антител, описанных в данном документе.

Изобретение также относится к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который перекрестно конкурирует за связывание с TIGIT человека с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, описанным в данном документе.

Антитела по изобретению способствуют провоспалительной активности Т-клеток

Антитела по данному изобретению (например, антитело 31282) неожиданно эффективны в отношении стимуляции провоспалительной активности $CD8^+$ Т-клеток. Как продемонстрировано в примерах, антитела или антигенсвязывающие фрагменты по данному изобретению (особенно 31282) более эффективны в отношении стимулирования провоспалительной активности $CD8^+$ Т-клеток (на что указывает высвобождение ИФН γ), чем антитела-компараторы против TIGIT (см. фиг. 24). Эта улучшенная эффективность по сравнению с антителами-компараторами была продемонстрирована в TIGIT-экспрессирующих трансгенных репортерных клетках Jurkat и в первичных $CD8$ Т-клетках. Соответственно, в определенных вариантах осуществления данного изобретения, анти-TIGIT антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, демонстрируют EC_{50} активации менее 5 нМ для TIGIT человека, экспрессируемого репортерными клетками Jurkat, как описано в примере 19. В предпочтительных таких вариантах осуществления данного изобретения, антитело или антигенсвязывающий фрагмент демонстрируют EC_{50} от около 1 до около 4 нМ, предпочтительно от около 2 нМ до около 4 нМ.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, анти-TIGIT антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, демонстрируют EC_{50} активации менее чем 0,4 нМ для $CD8$ Т-клеток от здоровых людей, как описано в примере 19. Активность $CD8$ Т-клеток (то есть провоспалительная активность) может быть измерена по продукции воспалительных цитокинов (например, ИФН γ). В предпочтительных таких вариантах осуществления данного изобретения, антитело

или антигенсвязывающий фрагмент демонстрируют EC_{50} от около 0,05 до около 0,4 нМ, предпочтительно от около 0,1 до около 0,2 нМ. Предпочтительно EC_{50} определяют с использованием CD8+ Т-клеток из МКПК, взятых у здорового человека, как описано в примере 19.

В прилагаемых примерах дополнительно и неожиданно продемонстрировано, что предоставленные анти-TIGIT антитела эффективны в увеличении активности гамма-дельта ($\gamma\delta$ или g/d) Т-клеток (т.е. Т-клеток, экспрессирующих субъединицы $\gamma\delta$ TCR, в отличие от обычных субъединиц $\alpha\beta$ TCR). Такие $\gamma\delta$ Т-клетки образуют особый и важный компонент иммунной системы, и способность антител, представленных в данном документе, стимулировать активность этих клеток, подчеркивает полезность антител.

Соответственно, в данном документе также представлен способ стимулирования активности $\gamma\delta$ Т-клеток, включающий приведение в контакт популяции $\gamma\delta$ Т-клеток с анти-TIGIT антителом. В определенных вариантах осуществления данного изобретения, способ выполняется *in vitro*. В определенных вариантах осуществления данного изобретения, способ выполняется *in vivo* у субъекта человека. В некоторых таких вариантах осуществления данного изобретения, субъект человек болен раком. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, анти-TIGIT антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит комбинацию последовательностей HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 антитела согласно данному изобретению. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, анти-TIGIT антитело содержит переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, при этом HCDR1 содержит SEQ ID NO: 16, HCDR2 содержит SEQ ID NO: 17, HCDR3 содержит SEQ ID NO: 18, и LCDR1 содержит SEQ ID NO: 61, LCDR2 содержит SEQ ID NO: 62, и LCDR3 содержит SEQ ID NO: 63.

Селективное истощение Treg клеток

Как продемонстрировано в данном документе, анти-TIGIT антитела способны избирательно истощать TIGIT-экспрессирующие Treg клетки. То есть анти-TIGIT антитела снижают долю TIGIT-экспрессирующих Treg клеток относительно общей популяции Т-клеток в большей степени, чем они уменьшают долю эффекторных или CD4 или CD8 Т-клеток памяти.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент селективно истощают TIGIT-экспрессирующие Treg клетки.

Это избирательное истощение TIGIT-экспрессирующих Treg-клеток может быть опосредовано посредством селективного лизиса TIGIT-экспрессирующих Treg (например, с помощью АЗКЦ или CDC (см. фиг. 20, 21 и 25). TIGIT-экспрессирующие Treg, как полагают, являются более мощными регуляторными клетками, чем не экспрессирующие TIGIT Treg. Не желая быть связанными теорией, селективное истощение путем лизиса TIGIT-экспрессирующих Treg-клеток, как ожидается, увеличит эффекторную функцию Т-клеток (например, опосредованную Т-клетками цитотоксичность, высвобождение провоспалительных цитокинов) за счет истощения общего количества Treg клеток, но также истощение этих Treg клеток, проявляющих более мощную регуляторную функцию. Эта повышенная эффекторная функция Т-клеток продемонстрирована на фиг. 24.

Следовательно, в определенных вариантах осуществления данного изобретения, антитела или антигенсвязывающие фрагменты по данному изобретению селективно лизируют TIGIT-экспрессирующие Treg клетки.

Избирательное истощение Treg клеток, экспрессирующих TIGIT, также может быть опосредовано путем индуцирования интернализации рецептора TIGIT таким образом, что он больше не экспрессируется на клеточной мембране. Не желая быть связанными какой-либо теорией, индуцируя интернализацию TIGIT таким образом, что TIGIT+ Treg клетки становятся TIGIT-Treg клетками, ожидается, что регуляторная функция этих клеток станет менее активной (поскольку TIGIT+ Treg являются более активными регуляторными клетками). В результате интернализации рецепторов и последующего снижения регуляторной активности этих Treg ожидается повышение эффекторной функции Т-клеток. Следовательно, в определенных вариантах осуществления данного изобретения, антитела или антигенсвязывающие фрагменты по данному изобретению ингибируют подавляющую активность TIGIT-экспрессирующих Treg клеток, предпочтительно, индуцируя интернализацию TIGIT с помощью TIGIT-экспрессирующих Treg клеток.

Для анти-TIGIT антител в соответствии с данным изобретением особенно полезно проявлять высокую аффинность к CD8 Т-клеткам и Treg-клеткам, а также проявлять избирательное истощение Treg-клеток, тем самым стимулируя эффекторную функцию Т-клеток посредством двух механизмов. Сохранение эффекторной функции антитела (например, АЗКЦ, CDC) приводит к эффективному истощению Treg, а селективность означает, что эффекторная функция антитела не приводит к нежелательному истощению эффекторных Т-клеток. Селективность особенно удивительна, так как предыдущие попытки получить анти-TIGIT антитело были направлены на устранение эффекторной функции антитела, чтобы избежать лизиса эффекторных Т-клеток, экспрессирующих TIGIT. Кроме того, поскольку антитела TIGIT по данному изобретению проявляют аффинность к эффекторным Т-клеткам (например, CD8 Т-клеткам), передача сигналов, опосредованная TIGIT, в этих клетках может быть ингибирована посредством конкуренции за связывание CD155 и/или индуцирования интернализации TIGIT на эффекторных Т-

клетках. В сочетании эти эффекты антител по данному изобретению могут приводить к значительному усилению эффекторной функции Т-клеток.

Другие неожиданные полезные свойства, проявляемые антителами и антигенсвязывающими фрагментами в соответствии с данным изобретением, включают повышение эффекторной функции Т-клеток (например, высвобождение провоспалительных цитокинов) в инфильтрирующих опухоль лимфоцитах (TIL). Воздействие микроокружения опухоли может привести к тому, что TIL проявляют энергические или так называемые "истощенные" фенотипы, возможно, вследствие чрезмерного воздействия антигена и/или иммуносупрессивного микроокружения опухоли. Желательно усиливать эффекторную функцию TIL, поскольку именно эти клетки проникают в саму опухоль и, таким образом, располагаются в локусе, наиболее подходящем для уменьшения размера или роста опухоли; однако из-за анергического или истощенного фенотипа многих TIL, как ожидается, будет трудно усилить их эффекторную функцию. Поэтому увеличение провоспалительного ответа от TIL после воздействия антител по данному изобретению является неожиданным и указывает на то, что антитела могут быть особенно эффективными терапевтическими агентами.

Еще более неожиданные полезные свойства, проявляемые антителами и антигенсвязывающими фрагментами, включают способность увеличивать провоспалительную активность гамма-дельта ($\gamma\delta$) Т-клеток. О способности стимулировать активность необычных Т-клеток, таких как $\gamma\delta$ Т-клетки, ранее не сообщалось для анти-TIGIT антитела, и это дает возможность лечить заболевания, отличные от рака, при которых известно, что $\gamma\delta$ Т-клетки важны. Например, сообщалось, что $\gamma\delta$ Т-клетки участвуют в ответе на патогенную инфекцию (бактериальную, вирусную (например, ЦМВ), грибковую), а также играют роль в защите от аутоиммунных заболеваний. Кроме того, удивительная способность стимулировать активность необычных Т-клеток обеспечивает дополнительную активность противоопухолевого действия антител.

В дополнительном аспекте предложен способ селективного истощения Treg клеток из популяции Т-клеток, включающий приведение в контакт популяции Т-клеток с анти-TIGIT антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, посредством чего анти-TIGIT антитело избирательно истощает популяцию Treg клеток. В определенных вариантах осуществления данного изобретения, способ выполняется *in vitro*. В определенных вариантах осуществления данного изобретения, способ выполняется *in vivo* у субъекта человека. В некоторых таких вариантах осуществления данного изобретения, субъект человек болен раком. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, анти-TIGIT антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит комбинацию последовательностей HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 антитела согласно данному изобретению. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, анти-TIGIT антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи, при этом HCDR1 содержит SEQ ID NO: 16, HCDR2 содержит SEQ ID NO: 17, HCDR3 содержит SEQ ID NO: 18, и LCDR1 содержит SEQ ID NO: 61, LCDR2 содержит SEQ ID NO: 62, и LCDR3 содержит SEQ ID NO: 63.

Как продемонстрировано в прилагаемых примерах, данное изобретение также относится к анти-TIGIT антителам, которые не конкурируют с CD155/PVR за связывание TIGIT. Следовательно, в дополнительном аспекте данное изобретение относится к антителу TIGIT человека или его антигенсвязывающему фрагменту, который не конкурирует с CD155/PVR за связывание TIGIT человека. В некоторых таких вариантах осуществления данного изобретения, Fab-фрагменты неконкурентных анти-TIGIT антител CD155 по данному изобретению демонстрируют K_D для TIGIT, измеренную с помощью ForteBio™, в диапазоне от 5×10^{-9} до 5×10^{-8} М, необязательно от 1×10^{-8} до 3×10^{-8} М.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, антитело может содержать вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи, при этом HCDR1 содержит SEQ ID NO: 280, HCDR2 содержит SEQ ID NO: 281, HCDR3 содержит SEQ ID NO: 282, и LCDR1 содержит SEQ ID NO: 292, LCDR2 содержит SEQ ID NO: 293, и LCDR3 содержит SEQ ID NO: 294. В некоторых таких вариантах осуществления данного изобретения, вариабельный домен тяжелой цепи может содержать аминокислотную последовательность, показанную как SEQ ID NO: 333, или аминокислотную последовательность, проявляющую идентичность последовательности по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99%, и вариабельный домен легкой цепи может содержать аминокислотную последовательность, показанную как SEQ ID NO: 334 или аминокислотной последовательностью, проявляющей по меньшей мере 90, 95, 97, 98 или 99% идентичности последовательности с ней.

Варианты осуществления изобретения, в которых аминокислотная последовательность домена VH демонстрирует менее чем 100% идентичность последовательности с последовательностью, показанной как SEQ ID NO: 333, тем не менее, может содержать CDR тяжелой цепи, которые идентичны HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 333 (SEQ ID NO: 280, 281 и 282 соответственно), хотя демонстрируют вариацию аминокислотной последовательности в каркасных участках. Аналогично, варианты осуществления изобретения, в которых аминокислотная последовательность домена VL проявляет менее чем 100% идентичность последовательности с последовательностью, показанной как SEQ ID NO: 334, тем не менее, может содержать CDR легкой цепи, которые идентичны LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 334 (SEQ ID NO: 292, 293 и 294 соответственно), в то же время демонстрируя вариацию аминокислотной

последовательности в каркасных участках.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, антитело может содержать вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи, при этом HCDR1 содержит SEQ ID NO: 353, HCDR2 содержит SEQ ID NO: 354, HCDR3 содержит SEQ ID NO: 355, LCDR1 содержит SEQ ID NO: 356, LCDR2 содержит SEQ ID NO: 357, LCDR3 содержит SEQ ID NO: 358. В некоторых таких вариантах осуществления данного изобретения, вариабельный домен тяжелой цепи может содержать аминокислотную последовательность, показанную как SEQ ID NO: 367, или аминокислотную последовательность, проявляющую идентичность последовательности по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99%, и вариабельный домен легкой цепи может содержать аминокислотную последовательность, показанную как SEQ ID NO: 368 или аминокислотной последовательностью, проявляющей по меньшей мере 90, 95, 97, 98 или 99% идентичности последовательности с ней.

Варианты осуществления изобретения, в которых аминокислотная последовательность домена VH демонстрирует менее чем 100% идентичность последовательности с последовательностью, показанной как SEQ ID NO: 367, тем не менее, может содержать CDR тяжелой цепи, которые идентичны HCDR1, HCDR2 и HCDR3 SEQ ID NO: 367 (SEQ ID NO: 353, 354 и 355 соответственно), хотя демонстрируют вариацию аминокислотной последовательности в каркасных участках. Аналогично, варианты осуществления изобретения, в которых аминокислотная последовательность домена VL проявляет менее чем 100% идентичность последовательности с последовательностью, показанной как SEQ ID NO: 368, тем не менее, может содержать CDR легкой цепи, которые идентичны LCDR1, LCDR2 и LCDR3 SEQ ID NO: 368 (SEQ ID NO: 356, 357 и 358 соответственно), в то же время демонстрируя вариацию аминокислотной последовательности в каркасных участках.

Полинуклеотиды. Векторы и экспрессионные системы

Изобретение также обеспечивает полинуклеотидные молекулы, кодирующие антитела TIGIT по данному изобретению, также векторы экспрессии, содержащие нуклеотидные последовательности, которые кодируют антитела TIGIT по данному изобретению, функционально связанные с регуляторными последовательностями, которые позволяют экспрессию антигенсвязывающего полипептида в клетке-хозяине или в бесклеточной системе экспрессии, и клетке-хозяине или бесклеточной системе экспрессии, содержащей этот вектор экспрессии.

Полинуклеотидные молекулы, кодирующие антитела TIGIT по данному изобретению, включают, например, молекулы рекомбинантных ДНК. Термины "нуклеиновая кислота", "полинуклеотид" или "полинуклеотидная молекула" используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к любой молекуле ДНК или РНК, одно- или двухцепочечной и, если она одноцепочечная, молекуле ее комплементарной последовательности. При обсуждении молекул нуклеиновой кислоты, последовательность или структура конкретной молекулы нуклеиновой кислоты могут быть описаны в данном документе в соответствии с обычным соглашением о представлении последовательности в направлении от 5' до 3'. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, нуклеиновые кислоты или полинуклеотиды являются "изолированными". Этот термин, когда применяется к молекуле нуклеиновой кислоты, относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая отделена от последовательностей, с которой она сразу же является смежной в естественном геноме организма, в котором она возникла. Например, "выделенная нуклеиновая кислота" может включать молекулу ДНК, вставленную в вектор, такой как плазмидный или вирусный вектор, или интегрированный в геномную ДНК прокариотической или эукариотической клетки или организма-хозяина, отличного от человека. Применительно к РНК термин "выделенный полинуклеотид" относится, прежде всего, к молекуле РНК, кодируемой выделенной молекулой ДНК, как определено выше. Альтернативно, термин может относиться к молекуле РНК, которая была очищена/отделена от других нуклеиновых кислот, с которыми она была бы связана в своем естественном состоянии (т.е. в клетках или тканях). Выделенный полинуклеотид (либо ДНК, либо РНК) может, кроме того, представлять собой молекулу, полученную непосредственно биологическим или синтетическим способом и отделенную от других компонентов, присутствующих в процессе его производства.

Для рекомбинантного продуцирования антитела TIGIT в соответствии с данным изобретением рекомбинантный полинуклеотид, кодирующий его, может быть получен (с использованием стандартных методов молекулярной биологии) и вставлен в реплицируемый вектор для экспрессии в выбранной клетке-хозяине или в бесклеточной системе экспрессии. Подходящими клетками-хозяевами могут быть клетки прокариот, дрожжей или высших эукариот, в частности клетки млекопитающих. Примерами пригодных линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия CV1 почки обезьяны, трансформированная SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); эмбриональная линия почки человека (клетки 293 или 293, субклонированные для роста в суспензионной культуре, Graham et al., J. Gen. Virol. 36: 59-74, 1977); клетки почек детенышей хомяка (BHK, ATCC CCL 10); клетки яичника китайского хомяка/-DHER (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216, 1980; или CHO derived clones like CHO-K1, ATCC CCL-61, Kao and Puck, Genetics of somatic mammalian cells, VII. Induction and isolation of nutritional mutants in Chinese hamster cells, Proc. Natl. Acad. Sci. 60: 1275-1281, 1968); клетки сертоли мыши (TM4; Mather, Biol. Reprod. 23: 243-252, 1980); клетки миеломы мыши SP2/0-AG14 (ATCC CRL 1581; ATCC CRL 8287) или NSO (коллекции культур HPA № 85110503); клетки почки обезьяны (CV1 ATCC CCL 70); клетки почки африкан-

ской зеленой мартышки (VERO-76, ATCC CRL-1587); клетки карциномы шейки матки человека (HELA, ATCC CCL 2); клетки почки собак (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени крыс буйвола (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легких человека (W138, ATCC CCL 75); клетки печени человека (Hep G2, HB 8065); опухоль молочной железы мыши (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI клетки (Mather et al., Annals NY Acad. Sci. 383: 44-68,1982); клетки MRC 5; клетки FS4; и линия гепатомы человека (Hep G2), а также клеточная линия PERC-6 DSM. Векторы экспрессии, подходящие для использования в каждой из этих клеток-хозяев, также в целом известны в данной области.

Следует отметить, что термин "клетка-хозяин" обычно относится к культивируемой клеточной линии. В целом люди, которым был введен вектор экспрессии, кодирующий антигенсвязывающий полипептид по данному изобретению, явно исключены из определения "клетки-хозяина".

В важном аспекте изобретение также обеспечивает способ получения антитела TIGIT по данному изобретению, который включает культивирование клетки-хозяина (или бесклеточной системы экспрессии), содержащей полинуклеотид (например, вектор экспрессии), кодирующий антитело TIGIT, в условиях, которые позволяют экспрессию антитела TIGIT и восстановление экспрессированного антитела TIGIT. Этот процесс рекомбинантной экспрессии может быть использован для крупномасштабного производства антител TIGIT по данному изобретению, включая моноклональные антитела, предназначенные для терапевтического применения у человека. Подходящие векторы, клеточные линии и производственные процессы для крупномасштабного производства рекомбинантных антител, подходящих для терапевтического применения *in vivo*, обычно доступны в данной области и будут хорошо известны специалистам в данной области.

Следовательно, в соответствии с данным изобретением обеспечивается выделенный полинуклеотид или комбинация выделенных полинуклеотидов, кодирующих антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащий комбинацию HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, причем эта комбинация выбрана из группы, состоящей из:

(i) HCDR1, содержащего SEQ ID NO: 16, HCDR2, содержащего SEQ ID NO: 17, HCDR3, содержащего SEQ ID NO: 18, LCDR1, содержащего SEQ ID NO: 61, LCDR2, содержащего SEQ ID NO: 62, и LCDR3, содержащего SEQ ID NO: 63;

(ii) HCDR1, содержащего SEQ ID NO: 4, HCDR2, содержащего SEQ ID NO: 5, HCDR3, содержащего SEQ ID NO: 6, LCDR1, содержащего SEQ ID NO: 49, LCDR2, содержащего SEQ ID NO: 50, и LCDR3, содержащего SEQ ID NO: 51;

(iii) HCDR1, содержащего SEQ ID NO: 7, HCDR2, содержащего SEQ ID NO: 8, HCDR3, содержащего SEQ ID NO: 9, LCDR1, содержащего SEQ ID NO: 52, LCDR2, содержащего SEQ ID NO: 53, и LCDR3, содержащего SEQ ID NO: 54;

(iv) HCDR1, содержащего SEQ ID NO: 10, HCDR2, содержащего SEQ ID NO: 11, HCDR3, содержащего SEQ ID NO: 12, LCDR1, содержащего SEQ ID NO: 55, LCDR2, содержащего SEQ ID NO: 56, и LCDR3, содержащего SEQ ID NO: 57;

(v) HCDR1, содержащего SEQ ID NO: 13, HCDR2, содержащего SEQ ID NO: 14, HCDR3, содержащего SEQ ID NO: 15, LCDR1, содержащего SEQ ID NO: 58, LCDR2, содержащего SEQ ID NO: 59, и LCDR3, содержащего SEQ ID NO: 60;

(vi) HCDR1, содержащего SEQ ID NO: 1, HCDR2, содержащего SEQ ID NO: 2, HCDR3, содержащего SEQ ID NO: 3, LCDR1, содержащего SEQ ID NO: 46, LCDR2, содержащего SEQ ID NO: 47, и LCDR3, содержащего SEQ ID NO: 48;

(vii) HCDR1, содержащего SEQ ID NO: 19, HCDR2, содержащего SEQ ID NO: 20, HCDR3, содержащего SEQ ID NO: 21, LCDR1, содержащего SEQ ID NO: 64, LCDR2, содержащего SEQ ID NO: 65, и LCDR3, содержащего SEQ ID NO: 66;

(viii) HCDR1, содержащего SEQ ID NO: 22, HCDR2, содержащего SEQ ID NO: 23, HCDR3, содержащего SEQ ID NO: 24, LCDR1, содержащего SEQ ID NO: 67, LCDR2, содержащего SEQ ID NO: 68, и LCDR3, содержащего SEQ ID NO: 69;

(ix) HCDR1, содержащего SEQ ID NO: 25, HCDR2, содержащего SEQ ID NO: 26, HCDR3, содержащего SEQ ID NO: 27, LCDR1, содержащего SEQ ID NO: 70, LCDR2, содержащего SEQ ID NO: 71, и LCDR3, содержащего SEQ ID NO: 72;

(x) HCDR1, содержащего SEQ ID NO: 28, HCDR2, содержащего SEQ ID NO: 29, HCDR3, содержащего SEQ ID NO: 30, LCDR1, содержащего SEQ ID NO: 73, LCDR2, содержащего SEQ ID NO: 74, и LCDR3, содержащего SEQ ID NO: 75;

(xi) HCDR1, содержащего SEQ ID NO: 31, HCDR2, содержащего SEQ ID NO: 32, HCDR3, содержащего SEQ ID NO: 33, LCDR1, содержащего SEQ ID NO: 76, LCDR2, содержащего SEQ ID NO: 77, и LCDR3, содержащего SEQ ID NO: 78;

(xii) HCDR1, содержащего SEQ ID NO: 34, HCDR2, содержащего SEQ ID NO: 35, HCDR3, содержащего SEQ ID NO: 36, LCDR1, содержащего SEQ ID NO: 79, LCDR2, содержащего SEQ ID NO: 80, и LCDR3, содержащего SEQ ID NO: 81;

(xiii) HCDR1, содержащего SEQ ID NO: 37, HCDR2, содержащего SEQ ID NO: 38, HCDR3, содержащего SEQ ID NO: 39, LCDR1, содержащего SEQ ID NO: 82, LCDR2, содержащего SEQ ID NO: 83, и

LCDR3, содержащего SEQ ID NO: 84;

(xiv) HCDR1, содержащего SEQ ID NO: 40, HCDR2, содержащего SEQ ID NO: 41, HCDR3, содержащего SEQ ID NO: 42, LCDR1, содержащего SEQ ID NO: 85, LCDR2, содержащего SEQ ID NO: 86, и LCDR3, содержащего SEQ ID NO: 87;

(xv) HCDR1, содержащего SEQ ID NO: 43, HCDR2, содержащего SEQ ID NO: 44, HCDR3, содержащего SEQ ID NO: 45, LCDR1, содержащего SEQ ID NO: 88, LCDR2, содержащего SEQ ID NO: 89, и LCDR3, содержащего SEQ ID NO: 90;

(xvi) HCDR1, содержащего SEQ ID NO: 271, HCDR2, содержащего SEQ ID NO: 272, HCDR3, содержащего SEQ ID NO: 273, LCDR1, содержащего SEQ ID NO: 283, LCDR2, содержащего SEQ ID NO: 284, и LCDR3, содержащего SEQ ID NO: 285;

(xvii) HCDR1, содержащего SEQ ID NO: 274, HCDR2, содержащего SEQ ID NO: 275, HCDR3, содержащего SEQ ID NO: 276, LCDR1, содержащего SEQ ID NO: 286, LCDR2, содержащего SEQ ID NO: 287, и LCDR3, содержащего SEQ ID NO: 288;

(xviii) HCDR1, содержащего SEQ ID NO: 277, HCDR2, содержащего SEQ ID NO: 278, HCDR3, содержащего SEQ ID NO: 279, LCDR1, содержащего SEQ ID NO: 289, LCDR2, содержащего SEQ ID NO: 290, и LCDR3, содержащего SEQ ID NO: 291.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается выделенный полинуклеотид или комбинация выделенных полинуклеотидов, кодирующих антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащий комбинацию HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, при этом:

(i) HCDR1 содержит или состоит из SEQ ID NO: 16, HCDR2 содержит или состоит из SEQ ID NO: 17, HCDR3 содержит или состоит из SEQ ID NO: 18, LCDR1 содержит или состоит из SEQ ID NO: 61, LCDR2 содержит или состоит из SEQ ID NO: 62, и LCDR3 содержит или состоит из SEQ ID NO: 63.

Также в соответствии с данным изобретением предлагается выделенный полинуклеотид или комбинация выделенных полинуклеотидов, кодирующих антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе. В определенных вариантах осуществления данного изобретения предоставляется выделенное полинуклеотидное кодирующее антитело 31282, представленное в данном документе, или его антигенсвязывающий фрагмент.

Также в соответствии с данным изобретением предлагается выделенный полинуклеотид, кодирующий домен VH и/или VL анти-TIGIT антитела, при этом полинуклеотид содержит одну или более последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 241-270, 335-342 и 369-370. В определенных вариантах осуществления данного изобретения, выделенный полинуклеотид содержит последовательность согласно SEQ ID NO: 251 и/или последовательность согласно SEQ ID NO: 252. В определенных вариантах осуществления данного изобретения, при этом полинуклеотид включает последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 251 и последовательность согласно SEQ ID NO: 252 последовательности являются смежными. В определенных вариантах осуществления данного изобретения, при этом полинуклеотид включает последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 251 и последовательность согласно SEQ ID NO: 252, последовательности не являются смежными.

Кроме того, в соответствии с данным изобретением предлагается вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид по данному изобретению, функционально связанный с регуляторными последовательностями, которые обеспечивают экспрессию антигенсвязывающего полипептида в клетке-хозяине или бесклеточной системе экспрессии.

Кроме того, в соответствии с данным изобретением предлагается клетка-хозяин или бесклеточная система экспрессии, содержащая вектор экспрессии в соответствии с данным изобретением.

Кроме того, в соответствии с данным изобретением предлагается способ получения рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, который включает культивирование клетки-хозяина или бесклеточной системы экспрессии по данному изобретению в условиях, которые позволяют экспрессию антитела или антигенсвязывающего фрагмента, и восстановление экспрессированного антитела или антигенсвязывающего фрагмента.

Фармацевтические композиции

В данном документе также представлены фармацевтические композиции, содержащие антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно данному изобретению, приготовленные с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями или наполнителями. Такие композиции могут включать одно или комбинацию (например, двух или более разных) антител TIGIT. Способы приготовления антител для терапевтического применения у людей хорошо известны в данной области и рассматриваются, например, в Wang et al., Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol.96, pp1-26, 2007.

Антитела TIGIT и фармацевтические композиции, представленные в данном документе, имеют применение в терапии, в частности, при терапевтическом лечении заболеваний, в частности состояний, которые выигрывают от ингибирования функции TIGIT.

Комбинационные продукты

Как продемонстрировано в данном документе, антитела по данному изобретению или их антигенсвязывающие фрагменты особенно эффективны при введении в сочетании с ингибиторами иммунной контрольной точки, в частности анти-ICOS антителами-антагонистами или анти-PD-1 антителами (то

есть антителами-антагонистами, специфичными для иммунорегуляторной молекулы человека PD-1). Введение анти-TIGIT антител в сочетании с анти-ICOS или анти-PD-1 антителом приводит к синергетическому снижению роста опухоли по сравнению только с антителом. Ожидается, что аналогичные эффекты будут наблюдаться при использовании комбинации анти-TIGIT антитела по данному изобретению и анти-PD-L1 антитела.

В данном документе также продемонстрировано, что антитела по данному изобретению или их антигенсвязывающие фрагменты особенно эффективны при введении в комбинации с антителом-агонистом, специфичным к костимулирующей молекуле контрольной точки иммунитета, в частности, анти-4-1BB, анти-OX40 или анти-GITR антитела-агониста. Введение анти-TIGIT антител в комбинации с анти-4-1BB, анти-OX40 или анти-GITR антителами-агонистами приводит к синергетическому снижению роста опухоли по сравнению с одним антителом.

В дополнительном аспекте предлагается комбинированный продукт, содержащий анти-TIGIT антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и одно или более из химиотерапевтического агента, анти-PD1 антитела, анти-PD-L1 антитела, анти-41BB антитела, анти-OX40 антитела, анти-GITR антитела и анти-ICOS антитела. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, анти-TIGIT антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, предоставленный в соответствии с данным изобретением. В наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения, анти-TIGIT антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит комбинацию HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, при этом:

HCDR1 содержит SEQ ID NO: 16 (YTFTSYMMH),
HCDR2 содержит SEQ ID NO: 17 (VIGPSGASTSYAQKFQG),
HCDR3 содержит SEQ ID NO: 18 (ARDHSDYWSGIMEV),
LCDR1 содержит SEQ ID NO: 61 (RASQSVRSSYLA),
LCDR2 содержит SEQ ID NO: 62 (GASSRAT) и
LCDR3 содержит SEQ ID NO: 63 (QQYFSPWT).

Также предоставлена комбинация, представленная в данном документе, для использования в способе лечения рака или вирусной инфекции, необязательно, причем вирусная инфекция представляет собой ЦМВ инфекцию. Далее предоставлена комбинация, представленная в данном документе, для использования в способе, представленном в данном документе.

Как используется в данном документе, когда два или более активных агента представлены в виде "комбинации", "терапевтической комбинации" или "комбинированной терапии" (термины используются взаимозаменяемо), это не требует или исключает, что активные агенты присутствуют в одном составе. Комбинированная терапия имеет свою традиционную интерпретацию двух или более активных агентов, которые должны быть введены так, чтобы пациент мог получить пользу от каждого агента. "Комбинированная терапия" не требует совместного приготовления, совместного введения, одновременного введения или введения фиксированной дозы.

Терапевтические способы

Антитела TIGIT или их антигенсвязывающие фрагменты и фармацевтические композиции, представленные в данном документе, могут быть использованы для ингибирования роста раковых опухолевых клеток *in vivo* и поэтому полезны при лечении опухолей.

Соответственно, дополнительные аспекты изобретения относятся к способам ингибирования роста опухолевых клеток у пациента-человека, а также к способам лечения или профилактики рака, которые включают введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела TIGIT или антигенсвязывающего фрагмента в виде описанной в данном документе фармацевтической композиции, как описано в данном документе, или комбинации, как описано в данном документе.

Другой аспект изобретения относится к антителу TIGIT или его антигенсвязывающему фрагменту, как описано в данном документе, для применения при ингибировании роста опухолевых клеток у пациента-человека. Еще один аспект изобретения относится к антителу TIGIT или его антигенсвязывающему фрагменту, как описано в данном документе, для применения в лечении или профилактике рака у пациента-человека.

В другом аспекте данное изобретение относится к способу селективного истощения Treg клеток у больного раком, включающему введение пациенту анти-TIGIT антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, анти-TIGIT антитело связывается с эпитопом TIGIT человека, содержащем остатки Q56, N58, E60, I68, L73, H76 и I109, предпочтительно состоящем из остатков Q56, N58, E60, I68, L73, H76 и I109. В определенных вариантах осуществления данного изобретения, анти-TIGIT антитело представляет собой анти-TIGIT антитело, представленное в данном документе.

В определенных вариантах осуществления данного изобретения, анти-TIGIT антитело содержит комбинацию HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где: HCDR1 содержит или состоит из SEQ ID NO: 16 (YTFTSYMMH), HCDR2 содержит или состоит из SEQ ID NO: 17 (VIGPSGASTSYAQKFQG), HCDR3 содержит или состоит из SEQ ID NO: 18 (ARDHSDYWSGIMEV), LCDR1 содержит или состоит из SEQ ID NO: 61 (RASQSVRSSYLA), LCDR2 содержит или состоит из SEQ ID NO: 62

(GASSRAT), и Lcdr3 содержит или состоит из SEQ ID NO: 63 (QQYFSPWWT).

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения, пациент, подлежащий лечению, имеет рак, выбранный из: рака почки (например, почечно-клеточного рака), рака молочной железы, опухолей головного мозга, хронических или острых лейкозов, включая острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, хроническую лимфоцитарную лейкемию, лимфомы (например, лимфома Ходжкина и неходжкинская лимфома, лимфоцитарная лимфома, первичная лимфома ЦНС, В-клеточная лимфома (например, ХЛЛ), Т-клеточная лимфома (например, синдром Сезари)), рака носоглотки, меланомы (например, метастатическая злокачественная меланома), рака предстательной железы, рака толстой кишки, рака легкого, рака кости, рака поджелудочной железы, рака кожи, рака головы или шеи (например, плоскоклеточный рак головы и шеи (HNSCC)), рака кожи, злокачественной меланомы кожи или внутриглазного канала, рака матки, рака яичников, рака прямой кишки, рака анальной области, рака желудка, рака яичка, рака матки, рака маточных труб, рака эндометрия, рака шейки матки, рака влагалища, рака вульвы, рака пищевода, рака тонкого кишечника, рака эндокринной системы, рака щитовидной железы, рака околощитовидной железы, рака надпочечника, саркомы мягких тканей, рака мочеиспускательного канала, рака полового члена, солидные опухоли детского возраста, рака мочевого пузыря, рака почки или мочеточника, рака почечной лоханки, новообразования центральной нервной системы (ЦНС), ангиогенеза опухоли, опухоли оси позвоночника, глиомы ствола головного мозга, аденомы гипофиза, саркомы Капоши, эпидермоидного рака, плоскоклеточного рака, мезотелиомы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, ингибированный рак представляет собой рак легкого, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак почки (например, рак почки), рак головы и шеи (например, HNSCC) или рак толстой кишки (например, аденокарцинома толстой кишки). В определенных вариантах осуществления данного изобретения, рак представляет собой рак толстой кишки (например, аденокарциному толстой кишки) или рак легкого. В определенных вариантах осуществления данного изобретения, рак представляет собой рак крови. В некоторых таких вариантах осуществления данного изобретения, рак представляет собой лимфому. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, рак представляет собой Т-клеточную лимфому или В-клеточную лимфому.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, способ лечения рака дополнительно включает введение дополнительного терапевтического агента, например, химиотерапевтического агента.

Как продемонстрировано в данном документе, антитела по данному изобретению или их антигенсвязывающие фрагменты особенно эффективны при введении в сочетании с ингибиторами иммунной контрольной точки, в частности анти-ICOS антителами-антагонистами или анти-PD-1 антителами (то есть антителами-антагонистами, специфичными для иммунорегуляторной молекулы человека PD-1). Введение анти-TIGIT антител в сочетании с анти-ICOS или анти-PD-1 антителом приводит к синергетическому снижению роста опухоли по сравнению только с антителом. Ожидается, что аналогичные эффекты будут наблюдаться при использовании комбинации анти-TIGIT антитела по данному изобретению и анти-PD-L1 антитела.

В данном документе также продемонстрировано, что антитела по данному изобретению или их антигенсвязывающие фрагменты особенно эффективны при введении в комбинации с антителом-агонистом, специфичным к стимулирующей молекуле контрольной точки иммунитета, в частности, анти-4-1BB, анти-OX40 или анти-GITR антитела-агониста. Введение анти-TIGIT антител в комбинации с анти-4-1BB, анти-OX40 или анти-GITR антителами-агонистами приводит к синергетическому снижению роста опухоли по сравнению с одним антителом.

Следовательно, в данном документе также предложен способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества анти-TIGIT антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно данному изобретению, а также введение эффективного количества анти-PD-1 антитела, анти-PD-L1 антитела, анти-4-1BB антитела, анти-OX40 антитела и анти-GITR антитела или анти-ICOS антитела.

Кроме того, данные, представленные в данном документе, демонстрирующие, что анти-TIGIT антитела могут повышать активность $\gamma\delta$ -клеток, а также обычных Т-клеток, указывают на то, что анти-TIGIT антитела можно использовать для лечения состояний, отличных от рака. В частности, известно, что $\gamma\delta$ Т-клетки важны в ответе на инфекцию, например, бактериальную, грибковую или вирусную инфекцию. Как продемонстрировано в примере 29, при контакте с анти-TIGIT антителом $\gamma\delta$ Т-клетки от ЦМВ серопозитивных субъектов демонстрируют заметно повышенную активацию, характеризующуюся увеличением среза ИФН γ . Способность таким образом стимулировать активацию $\gamma\delta$ Т-клеток у пациентов с ЦМВ указывает на то, что введение анти-TIGIT антитела будет стимулировать противовирусную активность $\gamma\delta$ Т-клеток.

Соответственно, в данном документе предложен способ лечения вирусной инфекции у субъекта, включающий введение эффективного количества анти-TIGIT антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Также предоставлен способ лечения вирусной инфекции у субъекта, включающий введение эффективного количества анти-TIGIT антитела или антигенсвязывающего фрагмента или фармацевтиче-

ской композиции, предоставленной в данном документе, субъекту, таким образом, вылечивая вирусную инфекцию. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения вирусная инфекция представляет собой ЦМВ инфекцию.

В определенных вариантах осуществления данного изобретения, способ дополнительно включает введение одного или более дополнительных терапевтических агентов. В определенных вариантах осуществления данного изобретения, один или более терапевтических агентов выбраны из: анти-PD1 антитела, анти-PD-L1 антитела, анти-41BB антитела, анти-OX40 антитела, анти-GITR антитела и анти-ICOS антитела.

Как продемонстрировано в примерах, анти-TIGIT антитела, описанные в данном документе, эффективны в отношении стимулирования активности Т-клеток, особенно провоспалительной активности Т-клеток. Общую активность Т-клеток можно измерить способами, известными специалистам в данной области, например, путем измерения продукции ИФН γ , как описано в примерах.

Соответственно, в данном документе также представлен способ стимулирования активности Т-клеток, включающий приведение в контакт популяции Т-клеток с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, как описано в данном документе.

В определенных вариантах осуществления данного изобретения, способ стимулирования активности Т-клеток осуществляют *in vitro*. В определенных вариантах осуществления данного изобретения, способ стимулирования активности Т-клеток осуществляют *in vivo* у человека. В некоторых таких вариантах осуществления данного изобретения, субъект-человек болен раком. В определенных вариантах осуществления данного изобретения, субъект-человек имеет вирусную инфекцию, например, ЦМВ инфекцию.

В определенных вариантах осуществления данного изобретения, способ стимулирует обычную активность $\alpha\beta$ Т-клеток. В определенных вариантах осуществления данного изобретения, способ стимулирует активность CD4 Т-клеток. В определенных вариантах осуществления данного изобретения, способ стимулирует активность CD8 Т-клеток. В определенных вариантах осуществления данного изобретения, способ стимулирует активность $\gamma\delta$ (гамма-дельта) Т-клеток.

Кроме того, в примерах продемонстрировано, что анти-TIGIT антитела, описанные в данном документе, будут особенно эффективными в стимулировании активности Т-клеток при использовании в комбинации с анти-PD1 антителом, анти-PD-L1 антителом, анти-41BB антителом, анти-OX40 антителом, анти-GITR антителом или анти-ICOS антителом. Важно отметить, что комбинация обеспечивает синергетическое (т.е. большее, чем аддитивное) увеличение активности Т-клеток.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения, способ стимулирования активности Т-клеток дополнительно включает приведение в контакт популяции Т-клеток с одним или более из: анти-PD1 антитела, анти-PD-L1 антитела, анти-41BB антитела, анти-OX40 антитела, анти-GITR антитела и анти-ICOS антитела.

Варианты и эквиваленты вариантов осуществления изобретения, описанных в данном документе, но не выходящих за пределы сущности и объема изобретения, будут известны специалисту в данной области. Изобретение будет более понятно со ссылкой на следующие неограничивающие примеры.

Примеры

Пример 1. Выбор антигенсвязывающих белков TIGIT.

ABP TIGIT были выбраны из синтетической библиотеки человеческих антител, экспрессированных и представленных на поверхности дрожжевых клеток в формате IgG, как правило, как описано, например, в WO 2009036379; WO 2010105256; WO 2012009568; и Xu et al., Protein Eng Des Sel., Vol. 26 (10), pp. 663-670 (2013), а более конкретно, как указано ниже. Последовательности и характеристики ABP, выделенных из рекомбинантной библиотеки, представлены на фиг. 1-6.

Восемь наивных человеческих синтетических дрожжевых библиотек, каждая из $\sim 10^9$ разнообразия, были размножены, как описано ранее (см., например: Xu et al., 2013; WO 2009036379; WO 2010105256; и WO 2012009568). Для первых двух раундов отбора была проведена методика сортировки магнитными шариками с использованием системы Miltenyi MACS, как описано (см., например, Siegel et al., 2004). Вкратце, дрожжевые клетки ($\sim 10^{10}$ клеток/библиотека) инкубировали с биотинилированным антигеном TIGIT-Fc (Creative Biomart) в промывочном буфере FACS (фосфатно-солевой буфер (ФСБ)/0,1% бычьего сывороточного альбумина (БСА)). После однократной промывки 50 мл ледяного промывочного буфера осадок клеток ресуспендировали в 40 мл промывочного буфера и к дрожжам добавляли стрептавидиновые микрошарики (500 мкл) и инкубировали в течение 15 мин при 4°C. Затем дрожжи осаждали, ресуспендировали в 5 мл промывочного буфера и загружали в колонку Miltenyi LS. После загрузки 5 мл, колонку промывали 3 раза 3 мл промывочного буфера FACS. Колонку затем удаляли из магнитного поля и дрожжи элюировали 5 мл питательной среды и затем выращивали в течение ночи. Следующие раунды сортировки были выполнены с использованием проточной цитометрии. Приблизительно 1×10^8 дрожжей осаждали, трижды промывали промывочным буфером и инкубировали с биотинилированным слитым антигеном TIGIT-Fc (10 нМ) в равновесных условиях при комнатной температуре. Затем дрожжи дважды промывали и окрашивали LC-FITC (разбавленным 1:100) и либо SA-633 (разбавленным 1:500), либо EA-

PE (разбавленным 1:50) вторичными реагентами в течение 15 минут при 4°C. После промывки дважды ледяным промывочным буфером клеточные осадки ресуспендировали в 0,4 мл промывочного буфера и переносили в пробирки с крышками, заполненными фильтром. Сортировка проводилась с использованием сортировщика FACS ARIA (BD Biosciences), и сортировочные ворота были назначены для выбора конкретных связующих по отношению к фоновому контролю. Последующие раунды отбора были использованы для того, чтобы уменьшить количество неспецифических связующих, использующих растворимые мембранные белки из клеток CHO (см., например, WO 2014179363 и Xu et al., Protein Eng Des Sel, Vol. 26 (10), pp. 663-670 (2013)) и идентифицируют связующие с улучшенной аффинностью к TIGIT с использованием антигена TIGIT-Fc. После последнего раунда сортировки дрожжи высевали и отбирали отдельные колонии для характеристики и назначения клонов для созревания аффинности. 63 клон были проверены на функциональную активность. Из скрининга клоны 26518, 26452, 26486, 26521 и 26493 обладали наилучшей функциональной активностью и были отобраны для дальнейшей оптимизации.

Пример 2. Оптимизация антитела.

Оптимизация наивных клонов проводилась с использованием трех стратегий созревания: диверсификация легкой цепи; диверсификация HCDR1 и HCDR2; и диверсификация HCDR3 в выбранных разнообразных пулах HCDR1 и HCDR2.

Диверсификация легкой цепи: Вариабельные участки тяжелой цепи были выделены из наивных выходов (описанных выше) и трансформированы в библиотеку легкой цепи с разнообразием 1×10^6 . Отборы осуществляли, как описано выше, с одним раундом сортировки MACS и тремя раундами сортировки FACS с использованием 10 нМ или 1 нМ биотинилированного антигена TIGIT-HIS (Creative Biomart) для соответствующих раундов.

Выбор HCDR1 и HCDR2: HCDR3 из клонов, отобранных в результате процедуры диверсификации легкой цепи, были рекомбинированы в предварительно приготовленную библиотеку с вариантами HCDR1 и HCDR2 с разнообразием 1×10^8 , и селекции проводили с использованием мономерного антигена HIS-TIGIT. Давление аффинности применяли, используя снижающиеся концентрации биотинилированного антигена HIS-TIGIT (от 100 до 1 нМ) в равновесных условиях при комнатной температуре.

Выборы HCDR3/HCDR1/HCDR2: Олиго были заказаны из IDT, которые содержали HCDR3, а также гомологичный фланкирующий участок по обе стороны от HCDR3. Позиции аминокислот в HCDR3 варьировались посредством разнообразия NNK в двух положениях на олиго по всему HCDR3. Олиго HCDR3 были двухцепочечными с использованием праймеров, которые отжигали по фланкирующему участку HCDR3. Оставшиеся FWR1-FWR3 вариабельного участка тяжелой цепи амплифицировали из пулов антител с улучшенной аффинностью, которые были выделены из разнообразий HCDR1 и HCDR2, выбранных выше. Затем библиотеку создавали путем трансформации двухцепочечного олиго HCDR3, объединенных фрагментов FWR1 в FWR3 и экспрессионного вектора тяжелой цепи в дрожжи, уже содержащие легкую цепь исходного наивного родителя. Отборы осуществлялись как и во время предыдущих циклов с использованием сортировки FACS для четырех раундов. Для каждого раунда FACS библиотеки оценивали на связывание PSR, перекрестную реактивность видов и давление аффинности, и проводили сортировку для получения популяций с желаемыми характеристиками. Давления аффинности для этих селекции выполняли, как описано выше в селекции HCDR1 и HCDR2.

Пример 3. Производство и очистка антител.

А. Производство в дрожжах.

Чтобы получить достаточные количества оптимизированных и неоптимизированных отобранных антител для дальнейшей характеристики, выращивали дрожжевые клоны до насыщения и затем индуцировали в течение 48 ч при 30°C при встряхивании. После индукции дрожжевые клетки осаждали и супернатанты собирали для очистки. IgG очищали с использованием колонки с белком А и элюировали уксусной кислотой, pH 2,0. Fab-фрагменты были получены путем расщепления папаином и очищены в два этапа с использованием белка А (GE LifeSciences) и KappaSelect (GE Healthcare LifeSciences).

В. Продукция в клетках млекопитающих.

Чтобы получить достаточные количества оптимизированных и неоптимизированных отобранных антител для дальнейшей характеристики, ДНК-вектор, кодирующий специфические клоны антител, генерировали и трансдуцировали в клетки НЕК. Оптимизированные по кодонам фрагменты синтетической ДНК человека для вариабельных доменов антител были заказаны в Geneart. Последовательности вариабельного домена плавно лигировали в векторы экспрессии rUPE, содержащие сигнальную последовательность мышинного Igкаппа и константные участки соответствующего класса антител. Векторы экспрессии были подтверждены рестрикционным анализом и секвенированием ДНК. Для транзientной трансфекции были получены maxiprepс ДНК, не содержащие эндотоксина (Sigma), и векторы тяжелой и легкой цепи были совместно трансфицированы в клетки НЕК293EBNA1 в среде Freestyle (ThermoFisher-Scientific) в соответствии с установленными протоколами. Приматон (0,55% конечного объема) добавляли через 24 часа после трансфекции. Кондиционированную среду собирали через 6 дней после трансфекции. Антитела очищали с помощью периодических процессов аффинной хроматографией Mabselect sureLX (GE Healthcare). Связанные антитела промывали в 2 этапа ФСБ, содержащим 1M NaCl и ФСБ.

Антитела элюировали 20 мМ цитратом, 150 мМ NaCl, pH 3, и нейтрализовали до приблизительно pH 7 с 1/6 объема 1 М K_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH 8.

Затем антитела дополнительно очищали гель-фильтрацией с использованием колонки Superdex200, уравновешенной в ФСБ. Фракции анализировали с помощью NuPAGE и фракции, содержащие антитела, объединяли. Конечные продукты стерилизовали через 0,22 мкМ шприцевой фильтр. Продукт анализировали с помощью NuPAGE, а уровни эндотоксина измеряли с помощью LAL-анализа.

Пример 4. Определение аффинности связывания анти-TIGIT антител с рекомбинантным белком TIGIT человека.

А. Измерения ForteBio K_D .

Измерения аффинности ForteBio для выбранных антител проводили в целом, как описано ранее (см., например, Estep et al., *Mabs*, Vol. 5 (2), pp. 270-278 (2013)). Вкратце, измерения аффинности ForteBio выполняли, загружая IgG онлайн на датчики ANQ. Датчики уравновешивали в автономном режиме в буфере для анализа в течение 30 минут и затем контролировали в режиме онлайн в течение 60 секунд для установления исходного уровня. Датчики с нагруженными IgG подвергали воздействию 100 нМ антигена (TIGIT-Fc человека, TIGIT-His человека или TIGIT-Fc человека) в течение 5 минут, после чего их переносили в буфер для анализа в течение 5 минут для измерения несоответствия. Кинетику анализировали с использованием модели связывания 1:1. Более чем 90 антител были проверены на аффинность с помощью ForteBio, и в табл. 3 представлены данные для 15 отобранных анти-TIGIT антител, демонстрирующих сильное связывание с рекомбинантным белком TIGIT.

В. Измерения MSD-SET K_D .

Измерения равновесной аффинности для выбранных антител проводили в целом, как описано ранее (Estep et al., *Mabs*, Vol. 5 (2), pp. 270-278 (2013)). Вкратце, равновесное титрование в растворе (SET) проводили в ФСБ + 0,1% БСА, не содержащей IgG (PBSF), с антигеном (мономер TIGIT-His), который оставался постоянным при 10-100 пМ и инкубировали с 3-5-кратными серийными разведениями Fab или мАт, начинающиеся с 10 пМ до 10 нМ. Антитела (20 нМ в ФСБ) наносили на стандартные планшеты для связывания MSD-ECL в течение ночи при 4°C или при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем планшеты блокировали с помощью БСА в течение 30 мин при встряхивании при 700 об/мин, после чего трижды промывали промывочным буфером (PBSF + 0,05% Твин 20). Образцы SET наносили и инкубировали на планшетах в течение 150 с при встряхивании при 700 об/мин с последующей одной промывкой. Антиген, захваченный на планшете, детектировали с меченым сульфотагом стрептавидином в концентрации 250 нг/мл в PBSF путем инкубации на планшете в течение 3 мин. Планшеты трижды промывали промывочным буфером и затем считывали на приборе MSD Sector Imager 2400, используя 1× считывающий буфер Т с поверхностно-активным веществом. Процент свободного антигена наносили на график как функцию титрованного антитела в Prism и соответствовали квадратному уравнению для извлечения K_D . Для повышения производительности в ходе экспериментов MSD-SET, включая подготовку образцов SET, использовались роботы для работы с жидкостью. Отобранные антитела были проверены на аффинность с помощью MSD, и в табл. 4 представлены данные для 7 клонов анти-TIGIT, демонстрирующих сильное связывание с рекомбинантным белком TIGIT.

Таблица 4

MSD-анализ аффинности к выбранным анти-TIGIT антителам

Клон	Аффинность MSD Моновалентное K_D (М) TIGIT- His человека
29489	1,1E-10
29494	7,0E-11
29499	1,9E-11
29513	2,5E-11
29520	2,1E-10
29523	1,7E-09
29527	6,4E-10

С. Измерение Biacore.

Биосенсорный анализ проводили при 25°C в буферной системе HBS-EP (10 мМ HEPES, pH 7,3, 150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,05% поверхностно-активного вещества P20) с использованием оптического биосенсора Biacore 8K, состыкованного с сенсорной микросхемой CM5 (GE Healthcare, Мальборо, Массачусетс). Образец отеля выдерживали при 8°C. Козлиное антитело против человеческого IgG (специфичное для Fc γ фрагмента, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Вест Гров, Пенсильвания; 109-005-098) иммобилизовали (11700 +/- 200 RU) в обеих проточных ячейках сенсорного чипа с использованием

стандартной химии сочетания аминов. Этот тип поверхности обеспечивал формат для воспроизводимого захвата свежего аналитического антитела после каждой стадии регенерации. Проточную ячейку 2 использовали для анализа захваченного антитела (60-90 RU), тогда как проточную ячейку 1 использовали в качестве контрольной проточной ячейки. Концентрации антигена в диапазоне от 30 до 0,123 нМ (3-кратные разведения) готовили в электродном буфере. Каждую из концентраций образца антигена запускали как один повтор. Также были запущены две пустые (буферные) инъекции, которые использовались для оценки и вычитания артефактов системы. Фазы ассоциации (300 с) и диссоциации (600 с) для всех концентраций антигена проводили при скорости потока 30 мкл/мин. Поверхность регенерировали с помощью трех последовательных инъекций (15 с, 15 с и 60 с) 10 мМ глицина, pH 1,5 при скорости потока 30 мкл/мин. Данные были выровнены, снабжены двойными ссылками и соответствовали модели привязки 1:1 с использованием оценочного программного обеспечения Biacore 8K, версия 1.0. Отобранные антитела были проверены на аффинность с помощью Biacore, и в табл. 5 представлены данные для 5 клонов анти-TIGIT, демонстрирующих сильное связывание с рекомбинантным белком TIGIT.

Таблица 5

Вiacore-анализ аффинности к выбранным анти-TIGIT антителам

Клон	Вiacore: K_D моновалентного (M) (IgG на чипе CM5, TIGIT-HIS человека в растворе (начальная концентрация 25 нМ, 3-кратное разведение)
29489	2,48E-10
31282	2,94E-10
29494	2,70E-10
29520	7,16E-10
29527	1,20E-09
31288	1,92E-10

Пример 5. Анализ конкуренции между антагонистическими анти-TIGIT антителами и природными лигандами TIGIT.

A. Octet Red384 эпитоп-специфическая сортировка /блокирование лиганда.

Эпитоп-специфическая сортировка/блокирование лиганда отобранных антител проводили с использованием стандартного перекрестного анализа сэндвич-формата. Контрольный IgG против мишени загружали на датчики ANQ, и незанятые Fc-связывающие сайты на датчике блокировали нерелевантным человеческим IgG1 антителом. Затем датчики подвергали воздействию 100 нМ целевого антигена (hTIGIT, Creative Biomart) с последующим добавлением второго антитела против мишени или лиганда (анти-TIGIT антитело и CD155 или CD113 или CD112). Данные были обработаны с использованием программного обеспечения ForteBio для анализа данных 7.0. Дополнительное связывание вторым антителом или лигандом после ассоциации антигена указывает на незанятый эпитоп (не конкурент), тогда как отсутствие связывания указывает на блокирование эпитопа (конкурент или блокирование лиганда). Родительские антитела (до оптимизации) тестировали на конкуренцию с природными лигандами, и в табл. 6 приведены данные, полученные для конкуренции с CD155, CD112 и CD113. Было обнаружено, что родительский клон 26432 не конкурирует с CD155 за связывание TIGIT. Все другие выбранные анти-TIGIT антитела конкурируют с природным лигандом за связывание с рекомбинантным белком TIGIT человека.

Таблица 6

Анализ сортировки против природных лигандов TIGIT для неоптимизированных анти-TIGIT антител

26518	Да	Да	Да
26452	Да	Да	Да
26486	Да	Да	Да
26521	Да	Да	Да
26493	Да	Да	Да
26432	Нет		

B. Конкуренция антагонистических анти-TIGIT антител с CD155 на Jurkat-hTIGIT.

Клетки Jurkat со сверхэкспрессией TIGIT человека (Jurkat-hTIGIT) собирали и распределяли по 10^5 клеток/лунка и инкубировали с анти-TIGIT антителами человека в следующих концентрациях: 166,6; 53,24; 17,01; 5,43; 1,73; 0,55; 0,17; 0,05; 0,01; $5,78 \times 10^{-3}$; $1,85 \times 10^{-3}$; $5,9 \times 10^{-3}$ нМ в полной среде в течение 45 мин при 37°C. Избыток антител промывали, а затем клетки инкубировали с CD155-His при 5 мкг/мл (Creative Biomart, PVR-3141H) в течение 45 минут при 37°C. Затем связанный CD155-His детектировали с использованием анти-His-метки-PE (Biolegend, 362603, 2 мкл на тест), инкубировали в течение 30 мин

при 4°C. Клетки анализировали с помощью FACS с использованием BD LSRFortessa, и половинной концентрации (IC_{50}), которая предотвращает связывание CD155, рассчитывали на основе средней геометрической флуоресценции.

Результаты были следующими: 0,101 нМ для клона 29489; 0,07 нМ для клона 29494; 0,102 нМ для клона 29520 и 0,078 нМ для клона 29527, для результатов, проиллюстрированных на фиг. 7. Значения других протестированных антител суммированы в табл. 7 ниже. В целом, результаты демонстрируют сильную конкуренцию тестируемых антагонистических анти-TIGIT антител с CD155 за связывание с мембраной, экспрессируемой TIGIT.

Таблица 7
Данные IC_{50} для конкуренции CD155 на TIGIT человека

29489	0,101
29494	0,070
29499	0,103
29513	0,094
29520	0,102
29523	0,079
29527	0,078

Пример 6. Характеристика гидрофобной хроматографии взаимодействия (MAbs.2015 May-Jun; 7(3):553-561).

Образцы анти-TIGIT антител IgG1 заменяли буфером на 1 М сульфат аммония и 0,1 М фосфат натрия при pH 6,5 с использованием спиновой колонки Zeba 40 кДа 0,5 мл (Thermo Pierce, cat # 87766). Градиент соли устанавливали на колонке Dionex ProPac HIC-10 из 1,8 М сульфата аммония, 0,1 М фосфата натрия при pH 6,5 до тех же условий что и без сульфата аммония. Градиент запускали в течение 17 минут при скорости потока 0,75 мл/мин. Стадия промывки ацетонитрилом была добавлена в конце цикла, чтобы удалить оставшийся белок, и колонку повторно уравнивали 7 объемами колонки перед следующим циклом инъекции. Время удержания пика контролировали при поглощении A280, а концентрации сульфата аммония при элюировании рассчитывали на основе градиента и скорости потока. В табл. 8 приведены результаты, полученные для 15 отобранных анти-TIGIT антител.

Таблица 8
Анализ хроматографии гидрофобного взаимодействия для выбранных анти-TIGIT антител

Клон	Хроматография гидрофобного взаимодействия (HIC) Время удерживания (мин)
26518	10,4
29478	12,7
26452	9,3
29487	9,9
29489	10,6
26486	11,0
29494	9,7
29499	9,1
26521	12,4
29513	12,5
26493	8,8
29520	9,6
29523	8,7
29527	8,6
26432	11,1
32919	9,0
32931	9,3
32959	12,0

Пример 7. Характеристика ПСР препарата полиспецифичного реагента.

А. Приготовление полиспецифичного реагента.

Полиспецифичный реагент (ПСР) готовили в соответствии с Xu et.al, mAbs 2013. Вкратце, в качестве исходного материала использовали 2,5 л клеток CHO-S. Клетки осаждали при 2400×g в течение 5 мин в центрифужных флаконах по 500 мл, заполненных до 400 мл. Клеточные осадки объединяли и затем ресуспендировали в 25 мл буфера В и осаждали при 2400×g в течение 3 мин. Буфер декантировали и промывку повторяли один раз. Клеточные осадки ресуспендировали в 3х объеме осадка буфером В, содержащем 1× ингибитор протеазы (Roche, cOmplete, без ЭДГА), с использованием политронного гомогенизатора с клетками, поддерживаемыми на льду. Затем гомогенат центрифугировали при 2400×g в течение 5 мин, и супернатант оставляли и осаждали еще один раз (2400×g/5 минут) для обеспечения удаления неразбитых клеток, клеточного дебриса и ядер; полученный супернатант представляет собой общий белковый препарат. Супернатант затем переносили в две 45 мл центрифужные пробирки Nalgene Oak Ridge и осаждали при 40000×g в течение 40 мин при 4°C. Супернатанты, содержащие отдельные цитозольные белки (SCP), затем переносили в чистые пробирки Oak Ridge и центрифугировали при 40000×g еще раз. Параллельно осадки, содержащие мембранную фракцию (EMF), удерживали и центрифугировали при 40000 в течение 20 мин для удаления остаточного супернатанта. Затем гранулы EMF промывали буфером В. 8 мл буфера В затем добавляли к мембранным осадкам для перемещения осадков и переноса в гомогенизатор Dounce. После того, как осадки были гомогенизированы, они были перенесены в коническую пробирку объемом 50 мл и представляли собой конечный препарат EMF.

Один миллиард клеток млекопитающих (например, CHO, HEK293, Sf9) при $\sim 10^6$ - 10^7 клеток/мл переносили из среды для культивирования тканей в 4×250 мл конические пробирки и осаждали при 550×g в течение 3 минут. Все последующие этапы выполняли при 4°C или на льду с ледяными буферами. Клетки промывали 100 мл PBSF (1× ФСБ + 1 мг/мл БСА) и объединяли в одну коническую пробирку. После удаления супернатанта клеточный осадок затем ресуспендировали в 30 мл буфера В (50 mM HEPES, 0,15 M NaCl, 2 mM CaCl₂, 5 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 10% глицерин, pH 7,2) и осаждали при 550×g в течение 3 мин. Надосадочную жидкость буфера В декантировали и клетки ресуспендировали в 3× объеме пеллет буфера В плюс 2,5×ингибитор протеазы (Roche, cOmplete, без ЭДТА). Ингибиторы протеазы в буфере В были включены далее. Клетки гомогенизировали четыре раза в течение 30-секундных импульсов (гомогенизатор Polyton, PT1200E) и мембранную фракцию осаждали при 40000×g в течение 1 ч при 4°C. Осадок промывали 1 мл буфера В; супернатант сохраняется и представляет собой s. Осадок переносят в гомогенизатор Dounce с 3 мл буфера В и ресуспендируют, медленно перемещая пестик вверх и вниз при 30-35 ударах. Фракция обогащенной мембраны (EMF) перемещается в новую пробирку для сбора, промывая пестик для сбора всего потенциального белка. Определите концентрацию белка в очищенной EMF, используя набор для анализа Dc-белка (BioRad). Чтобы растворить EMF, перенесли в буфер для солубилизации (50 mM HEPES, 0,15 M NaCl, 2 mM CaCl₂, 5 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1% n-додецил-b-D-мальтопиранозид (DDM), 1× ингибитор протеазы, pH 7,2) до конечной концентрации 1 мг/мл. Вращают смесь в течение ночи при вращении при 4°C с последующим центрифугированием в пробирке Oak Ridge на 50 мл (Fisher Scientific, 050529-ID) при 40000×g в течение 1 ч. Супернатант, который представляет собой растворимые мембранные белки (SMP), собирали и выход белка определяли количественно, как описано выше.

Для биотинилирования подготовили исходный раствор NHS-LC-биотина в соответствии с протоколом производителя (Pierce, Thermo Fisher). Вкратце, 20 мкл биотинового реагента добавляют к каждому 1 мг образца EMF и инкубируют при 4°C в течение 3 ч при осторожном перемешивании. Регулируют объем до 25 мл с помощью буфера В и переносят в центрифужную пробирку Oak Ridge. Осаждают биотинилированную EMF (b-EMF) при 40000×g в течение 1 ч и промывают два раза с 3 мл буфера С (буфер В минус глицерин), не нарушая осадок. Удаляют остатки раствора. Осадок ресуспендировали с помощью гомогенизатора Dounce в 3 мл буфера С, как описано ранее. Повторно суспендированный осадок теперь представляет собой биотинилированную EMF (b-EMF) и растворяется, как описано выше, для приготовления b-SMP.

В. Анализ связывания ПСР.

Анализ ПСР проводили в целом, как описано в WO 2014/179363. Вкратце, для характеристики профиля ПСР моноклональных антител, представленных на дрожжах, два миллиона IgG-представляющих дрожжей переносили в 96-луночный планшет для анализа и осаждали при 3000×g в течение 3 минут для удаления супернатанта. Ресуспендировали осадок в 50 мкл свежеприготовленного 1:10 разведения исходных b-ПСР и инкубировали на льду в течение 20 мин. Промывали клетки дважды с 200 мкл холодного PBSF и осадок повторно суспендировали в 50 мкл вторичной маркировочной смеси (Extravidin-R-PE, анти-человеческий LC-FITC и пропидий йодид). Выдерживали смесь на льду в течение 20 минут, а затем дважды промывали 200 мкл ледяного PBSF. Ресуспендировали клетки в 100 мкл охлажденного льдом PBSF и запускали планшет на FACS Canto (BD Biosciences), используя HTS инжектор образца. Данные проточной цитометрии анализировали на среднюю интенсивность флуоресценции в канале R-PE и нормализовали для надлежащего контроля для оценки неспецифического связывания. В табл. 9 обобщены результаты связывания реагента полиспецифичности, полученные для 15 отобранных

анти-TIGIT антител, которые подтверждают низкий балл для большинства клонов.

Таблица 9

Анализ полиспецифичного реагента

Клон	Оценка (0-1) Полиспецифичного реагента (ПСР)
26518	0,00
29478	0,01
26452	0,00
29487	0,01
29489	0,01
26486	0,00
29494	0,00
29499	0,10
26521	0,00
29513	0,01
26493	0,00
29520	0,32
29523	0,12
29527	0,12
26432	0,00
31288	0,00
32919	0,00
32931	0,00
32959	0,1

Пример 8. Характеристика экспрессии TIGIT на иммунных популяциях от МКПК здоровых людей.

А. Профиль экспрессии TIGIT на подмножествах Т-клеток.

Анализы с помощью проточной цитометрии были выполнены для оценки экспрессии TIGIT на подмножествах иммунных клеток в МКПК, только что выделенных у здоровых людей. Конъюгированные антитела были приобретены у Ebioscience/Thermo Fisher Scientific, BioLegend или BD Biosciences. Клетки окрашивали в соответствии с инструкцией производителя, используя отфильтрованный буфер FACS (ФСБ + 2 мМ ЭДГА + 0,1% БСА) и буфер Brilliant Stain (BD # 563794). Клетки блокировали с помощью соответствующего человеческого FcBlock (BD # 564220) перед окрашиванием и фиксировали, используя буфер для фиксации IC (eBioscience # 00-8222-49), до получения. Получение было выполнено на FACS Fortessa (BD Biosciences) и проанализировано с помощью программного обеспечения FlowJo (FlowJo, LLC). Жизнеспособные клетки были стробированы на прямом и боковом рассеянии. Различные подмножества иммунных клеток были стробированы следующим образом: CD19⁺ (В-клетки), CD3⁺ CD19⁻ CD14⁺ (Моноциты), CD3⁺ TCRab⁻ (TCRgd Т-клетки), CD3⁺ TCRab⁺ (TCRab Т-клетки), CD3⁺ CD19⁻ CD14⁻ HLA-DR⁻ CD56^{низкий/высокий} (НК-клетки), CD3⁻ CD19⁻ CD14⁻ HLA-DR⁺ (дендритные клетки), CD3⁺ TCRab⁺ CD4⁺ CD127^{низкий} CD25⁺ (regulatory Т-клетки), CD3⁺ TCRab⁺ CD4⁺ или CD8⁺ CD45RO⁻ CCR7⁺ (CD4 или CD8 наивные Т-клетки), CD3⁺ TCRab⁺ CD4⁺ или CD8⁺ CD45RO⁺ (Т-клетки памяти) и CD45RO⁻ CD62L⁺ (эффektorные Т-клетки).

Как продемонстрировано на фиг. 8А и 8В, TIGIT преимущественно экспрессируется на НК-клетках, регуляторных Т-клетках и CD8 Т-клетках памяти. Он в меньшей степени присутствует в других подгруппах Т-клеток с низкой долей наивных Т-клеток, демонстрирующих экспрессию TIGIT. Кроме того, TIGIT не экспрессируется на моноцитах, дендритных клетках и В-клетках (фиг. 8В). Этот набор данных согласуется с опубликованными данными (Yu et al. NI 2008 и Wang et al. EJI 2015).

Пример 9. Клеточное связывание антагонистических анти-TIGIT антител.

А. Связывание анти-TIGIT антител с Jurkat-hTIGIT и Jurkat-mTIGIT.

Аффинность человеческих анти-TIGIT антител измеряли с использованием клеток Jurkat E6.1, трансдуцированных с помощью человеческого TIGIT (Jurkat hTIGIT) или мышиного TIGIT (Jurkat-mTIGIT). Чтобы проанализировать аффинность выбранных антител к hTIGIT или mTIGIT, 10⁵ клеток распределяли на лунку и инкубировали с анти-TIGIT антителом в однократной дозе 100 нМ (табл. 3) или с уменьшающейся концентрацией (166,6; 53,24; 17, 01; 5,43; 1,73; 0,55; 0,17; 0,05; 0,01; 5,78×10⁻³; 1,85×10⁻³; 5,9×10⁻³ нМ) выбранных антител (фиг. 9). Антитела инкубировали с клетками в течение 20 мин при 4°С в буфере FACS. После отмывки клетки инкубировали с анти-человеческим Ig (специфичным для Fc-гамма)-PE (eBioscience, 12-4998-82, при 2,5 мкг/мл) в течение 20 мин на льду и дважды промывали.

Среднее геометрическое значение интенсивности флуоресценции анализировали с использованием LSR BD Fortessa. Связывание клеток регистрировали как среднюю интенсивность флуоресценции PE на трансфицированной линии по сравнению с нетрансфицированной линией для каждого антитела (табл. 3). Для расчета EC_{50} связывания половинную максимальную концентрацию связывания (EC_{50}) с hTIGIT-Jurkat рассчитывали с использованием уравнения соответствия кривой с четырьмя переменными в Prism, и полученные значения были следующими: 0,082 нМ для клона 29489; 0,07 нМ для клона 29494; 0,119 нМ для клона 29520 и 0,05 нМ для клона 29527 для данных, проиллюстрированных на фиг. 9. Результаты демонстрируют сильное связывание с экспрессируемым на мембране TIGIT человека для тестируемых анти-TIGIT антител.

В. Связывание антагонистических анти-TIGIT антител с первичными Т-клетками человека.

Изолированные человеческие МКПК от здоровых добровольцев анализировали на связывание с помощью антагонистических анти-TIGIT антител. Клетки распределяли по 5×10^5 клеток на лунку. Клетки инкубировали с анти-CD16 (клон 3G8, BioLegend 302002), CD32 (клон FL18.26, BD Bioscience 557333) и CD64 (BD Bioscience 555525) при комнатной температуре в течение 10 минут, и указанные анти-TIGIT антитела человека были непосредственно добавлены в конечной концентрации: 12,65; 4; 1,26; 0,40; 0,126; 0,040; 0,12 и 4×10^{-3} нМ в буфере FACS и инкубируют в течение 20 мин при 4°C. После отмывки клетки инкубировали с античеловеческим Ig (Fc-гамма-специфическим)-PE (eBioscience, 12-4998-82, при 2,5 мкг/мл) в течение 20 минут при 4°C. Затем клетки промывали и инкубировали со следующими антителами и смесью LVD для результатов фиг. 10A и 10B: анти-CD4-PercP-Cy5.5 (клон A161A1, BioLegend 357414); анти-CD8-BV510 (клон SK1, BD Bioscience 563919) и LVD efluor 520 (eBioscience 65-0867-14). Для фиг. 10C клетки промывали и инкубировали со следующими антителами и смесью LVD: LVD efluor 520 (eBioscience 65-0867-14), анти-TCRab-PercP-Cy5.5 (клон IP26, Biolegend 306723), анти-CD4-BV510 (клон SK3, BD Horizon 562970), анти-CD8-APC-Cy7 (клон SK1, Biolegend 344714), анти-CD25-BV605 (клон 2A3, Biolegend 562660), анти-CD127-APC (A019D5, Biolegend 351316), анти-CCR7-BV421 (клон G043H7, Biolegend 353207) и анти-CD45RO⁺ PE-Cy7 (клон UCHL1, Biolegend 304229).

Значение EC_{50} для связывания с CD8⁺ первичными Т-клетками человека рассчитывали, используя % положительных окрашенных TIGIT клеток на стробированных LVD⁺CD8⁺Т-клетках (фиг. 10A и 10B).

Значение EC_{50} для связывания с CD8⁺ Т-клетками памяти или первичными Treg клетками человека рассчитывали, используя % положительных окрашенных TIGIT-клеток на стробированных LVD⁺TCRab⁺CD45RO⁺CD8⁺ Т-клетках (для CD8⁺ Т-клеток памяти) или на стробированных LVD⁺TCRab⁺CD127^{lo}CD25^{hi}CD4⁺ Т-клетках (для Tregs) и проиллюстрированы на фиг. 10C.

Как продемонстрировано на фиг. 10A, значение EC_{50} для связывания с общими CD8⁺ Т-клетками человека составляет 0,123 нМ для клона 29489; 0,181 нМ для клона 29520 и 0,253 нМ для клона 29527. Было проведено прямое сравнение между 29489 и 31282 (мутант 29489 с мутацией М до Т в остатке 116), и значение EC_{50} составило 0,057 нМ и 0,086 нМ соответственно, демонстрируя сильную и сходную эффективность связывания с первичными CD8⁺ Т-клетками человека для 2 клонов (фиг. 10B). Значения EC_{50} , полученные для связывания с CD8⁺ Т-клетками памяти и Treg, составляли 0,039 нМ и 0,03 нМ соответственно, демонстрируя сильную и сходную аффинность для обеих популяций (фиг. 10C).

Связывание антагонистических анти-TIGIT антител с первичными Т-клетками яванца.

Изолированные МКПК от *Macaca flavicularis* были получены от BioPRIM. Клетки оттаивали и стимулировали с использованием набора для активации/размножения Т-клеток для примата, не являющегося человеком (Miltenyi Biotec), в соотношении 1:2 (соотношение шарик:клетка) в соответствии с инструкциями производителя. На следующий день клетки собирали, считали и распределяли по 5×10^4 клеток на лунку. Клетки инкубировали с анти-CD16 (клон 3G8, BioLegend 302002), CD32 (клон FL18.26, BD Bioscience 557333) и CD64 (BD Bioscience 555525) при комнатной температуре в течение 10 минут, и выбранные анти-TIGIT антитела человека были непосредственно добавлены в конечной концентрации: 12,65; 4; 1,26; 0,40; 0,126; 0,040; 0,12 и 4×10^{-3} нМ в буфере FACS и инкубируют в течение 20 мин при 4°C. После отмывки клетки инкубировали с анти-человеческим Ig (Fc-гамма-специфическим) -PE (eBioscience, 12-4998-82, при 2,5 мкг/мл) в течение 20 мин при 4°C. Затем клетки промывали и инкубировали со следующими антителами и смесью LVD для данных, проиллюстрированных на фиг. 11A и 11B: анти-CD4-PercP-Cy5.5 (клон A161A1, BioLegend 357414); анти-CD8-BV510 (клон SK1, BD Bioscience 563919), CD69-APC-Cy7 (клон FN50, BioLegend, 310914) и LVD efluor 520 (eBioscience 65-0867-14). Окрашенные клетки анализировали с помощью FACS с использованием BD LSR Fortessa. Значение связывания EC_{50} рассчитывали с использованием % положительных окрашенных TIGIT клеток, которые были локализованы на LVD-CD69⁺CD8⁺ Т-клетках. Как продемонстрировано на фиг. 11, значения EC_{50} для связывания с CD8⁺ Т-клетками яванца составляли 0,487 нМ для клона 29489, 1,73 нМ для клона 29520 и 0,378 нМ для клона 29527. Клоны 29489 и 31282 (мутант 29489 с мутацией М до Т в остатке 116) также сравнивали, и значения EC_{50} составляли 0,25 нМ и 0,26 нМ соответственно для примера, показанного на фиг. 11B, демонстрируя аналогичное и сильное сродство к первичным CD8⁺ Т-клеткам яванца для 2 клонов.

Пример 10. In vitro функциональная характеристика антагонистической анти-TIGIT активности.

А. Биоанализ TIGIT на совместное культивирование CHO-TCR-CD155 и Jurkat-hTIGIT.

Чтобы охарактеризовать функциональные последствия блокирования человеческого TIGIT-рецептора, мы совместно культивировали клетки Jurkat, которые экспрессируют hTIGIT, и репортер люциферазы, активированный после захвата TCR (Эффекторные клетки TIGIT формата "разморозь и используй" (Thaw-and-Use) от Promega), с клеточной линией CHO-K1, разработанной для экспрессии CD155 и TCR активатора человека ("разморозь и используй" CD155 aAPC/CHO-K1 от Promega). Активация TIGIT- сверхэкспрессирующих клеток Jurkat может быть индуцирована контактом с CD155-экспрессирующими клетками CHO-K1 при вовлечении TCR в клетки Jurkat и может быть увеличена в присутствии антагонистического анти-TIGIT антитела. Чтобы сравнить эффективность различных антител в увеличении активации клеток Jurkat, эксперимент проводился в присутствии возрастающих концентраций антител и рассчитывались значения EC_{50} .

Клетки CD155 aAPC/CHO-K1 (Promega, CS198811) формата "разморозь и используй" (Thaw-and-Use) высевали в соответствии с рекомендациями производителя и инкубировали при 37°C в 5% CO₂-инкубаторе O/N. На следующий день в соответствии с рекомендациями изготовителя добавляли эффекторные клетки Thaw-and-Use TIGIT (Promega, CS198811) в планшеты для клеток CD155 aAPC/CHO-K1, содержащие свежую полную среду с анти-TIGIT антителом при 133 нМ (фиг. 12A) или увеличивающие концентрации (0,22; 0,54; 1,36; 3,41; 8,53; 21,3; 53,3; 133,33 и 333 нМ) анти-TIGIT антитела (фиг. 12B) и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 6 ч.

После 6 ч инкубации активацию эффекторных клеток TIGIT оценивали путем измерения активности люциферазы с использованием системы анализа люциферазы Bio-Glo™ (Promega, G7941).

На фиг. 12A продемонстрировано влияние добавления выбранных клонов на сигнал люциферазы по сравнению с изотипическим контролем. Данные демонстрируют антагонистическую активность тех антител, которая приводила к более сильной активации клеток Jurkat-hTIGIT. Табл. 10 суммирует индукцию кратного изменения в экспрессии люциферазы, полученную для различных анти-TIGIT антител по сравнению с клоном изотипического контроля (03847).

Таблица 10

Индукция кратного изменения по изотипическому контролю

Имя клона	Индукция по изотипическому контролю (кратное изменение)
26518	2,89
29478	3,57
26452	2,9
29487	3,22
29489	4,08
26486	1,9
29494	3,42
29499	3,68
26521	2,66
29513	3,26
26493	0,96
29520	2,52
29523	2,4
29527	2,96
03847	1

Как продемонстрировано на фиг. 12B, активация клеток Jurkat-hTIGIT оценивалась с помощью анти-TIGIT антитела в диапазоне от 0,22 нМ до 333 нМ и давала значение EC_{50} 3,0 нМ для клона 29489; 4,4 нМ для клона 29494; 2,3 нМ для клона 29520 и 32 нМ для клона 29527; 2,7 нМ для клона 32919 и 3,2 нМ для клона 32931, демонстрирующие сильную функциональную активность, обусловленную блокированием ингибирующей передачи сигналов TIGIT. Клоны 29489 и 31282 (мутант 29489 с мутацией М до Т на остатке 116) также сравнивали, и значения EC_{50} были соответственно 4,3 нМ и 8,1 нМ для примера, показанного на фиг. 12C, демонстрируя аналогичную функциональную активность для 2 клонов.

В. Функциональный анализ первичных CD8⁺ Т-клеток человека.

Чтобы охарактеризовать функциональные последствия блокировки TIGIT-рецептора человека, мы совместно культивировали первичные CD8⁺ Т-клетки человека из МКПК здоровых человеческих доноров с клеточной линией CHO-K1, сконструированной для экспрессии CD155 человека и активации Т-клеток человека. Мы наблюдали, что высвобождение ИФНγ CD8⁺ Т-клетками в присутствии сконструированных CD155-экспрессирующих CHO-K1 клеток может быть увеличено путем блокирования hTIGIT

антагонистическими анти-TIGIT антителами. Чтобы сравнить эффективность этих антител в увеличении высвобождения ИФН γ , эксперимент проводили в присутствии возрастающих концентраций антител и рассчитывали значения EC_{50} .

Клетки CD155 aAPC/CHO-K1 (Promega, CS198811) формата "разморозь и используй" (Thaw-and-Use) высевали в 96-луночные планшеты с U-образным дном в соответствии с рекомендациями производителя и инкубировали при 37°C в 5% CO $_2$ -инкубаторе O/N. На следующий день CD8 $^+$ Т-клетки очищали в соответствии с рекомендациями производителя с использованием набора для отрицательной селекции (Stemcell Technologies, 17953) из замороженных моноклеарных клеток периферической крови человека, выделенных из крови здоровых доноров (Immunehealth). Очищенные CD8 Т-клетки затем инкубировали с возрастающими концентрациями (0,11 нМ, 0,33 нМ, 1,06 нМ, 3,3 нМ, 10,6 нМ, 33,3 нМ, 105,5 нМ и 333 нМ) антител (100000 CD8 Т-клеток/100 мкл полной среды, содержащей антитела) в течение 1 часа. После этого смесь антитело-CD8 добавляли к клеточным планшетам CD155 aAPC/CHO-K1, содержащим 50 мкл свежей полной среды, и инкубировали при 37°C, 5% CO $_2$ в течение 5 дней. Наконец, концентрации ИФН γ оценивали в клеточном супернатанте с использованием анализа ИФА (Affymetrix eBioscience, 88-7316-86), который проводили в соответствии с рекомендациями производителя.

Как продемонстрировано на фиг. 13А, все анти-TIGIT антитела увеличивали секрецию ИФН γ по сравнению с изотипическим контролем. Наибольшее увеличение наблюдалось у клона 29489 (6,4 раза), затем 29494 (5,8 раза), 29520 (5,4 раза), 29499 (5,2 раза), 29527 (4,5 раза) и 29513 (3,2 раза).

Исследование диапазона доз (между 0,22 нМ и 333 нМ анти-TIGIT антитела) также проводилось для оценки значения EC_{50} для увеличения секреции ИФН γ первичными Т-клетками CD8 человека. Как продемонстрировано на фиг. 13В, анти-TIGIT антитело 29489 показало наилучшую активность с EC_{50} 3,5 нМ, за ним следуют клон 29527 (EC_{50} = 5,1 нМ), клон 29494 (EC_{50} = 6,1 нМ) и клон 29520 (EC_{50} = 11,1 нМ). Наконец, клон 29489 и его мутант 31282 были протестированы параллельно и продемонстрировали аналогичную активность с соответствующим значением EC_{50} 0,49 нМ и 0,50 нМ (фиг. 13С). В целом эти данные демонстрируют сильную функциональную активность антагонистических анти-TIGIT антител в отношении блокирования ингибирующего сигнала TIGIT в CD8 $^+$ Т-клетках человека и усиления эффекторных функций, что характеризуется сильным увеличением продукции ИФН γ .

С. Функциональный анализ TIL человека.

Чтобы охарактеризовать функциональные последствия блокировки TIGIT-рецептора человека на инфильтрирующих лимфоцитах опухоли (TILs) пациентов больных раком, мы совместно культивировали первичные CD8 $^+$ Т-клетки человека из TIL пациента с асцитом яичников с клеточной линией CHO-K1, сконструированной для экспрессии CD155 человека и активации Т-клеток человека. Мы наблюдали, что высвобождение ИФН γ CD8 $^+$ Т-клетками в присутствии сконструированных CD155-экспрессирующих CHO-K1 клеток может быть увеличено путем блокирования hTIGIT антагонистическими анти-TIGIT антителами.

Клетки CD155 aAPC/CHO-K1 (Promega, CS198811) формата "разморозь и используй" (Thaw-and-Use) высевали в 96-луночные планшеты с U-образным дном в соответствии с рекомендациями производителя и инкубировали при 37°C в 5% CO $_2$ -инкубаторе O/N. На следующий день CD8 Т-клетки были очищены в соответствии с рекомендациями производителя с использованием набора для отрицательной селекции (Stemcell Technologies, 17953) из замороженных TIL человека, выделенных из асцита яичников (Immunehealth). Очищенные CD8 $^+$ Т-клетки затем инкубировали с клоном 26452 анти-TIGIT антитела, неоптимизированным родительским клоном 29489 и 31282 (100000 CD8 $^+$ Т-клеток/100 мкл полной среды, содержащей антитело) в течение 1 часа. После этого смесь антитело-CD8 добавляли к клеточным планшетам CD155 aAPC/CHO-K1, содержащим 50 мкл свежей полной среды, и инкубировали при 37°C, 5% CO $_2$ в течение 5 дней.

Наконец, концентрации ИФН γ оценивали в клеточном супернатанте с использованием анализа ИФА (Affymetrix eBioscience, 88-7316-86), который проводили в соответствии с рекомендациями производителя. Как видно на фиг. 14, секреция ИФН γ увеличивалась почти в 2 раза, когда к совместной культуре добавляли анти-TIGIT антитело. Эти данные демонстрируют сильную функциональную активность антагонистических анти-TIGIT антител для блокирования сигнала, ингибирующего TIGIT в CD8 $^+$ TIL человека и для усиления эффекторных функций Т-клеток в условиях опухоли.

Пример 11. Характеристика антагонистического анти-TIGIT антитела с функциональной активностью у мыши.

А. Анализ конкуренции CD155 мыши на суррогатное антагонистическое анти-TIGIT антитело.

Для этого анализа использовали клетки Jurkat (клон E6-1, ATCC TIB-152), сконструированные для сверхэкспрессии TIGIT мыши (Jurkat-mTIGIT). Анти-TIGIT антитело 26493 использовали в качестве суррогата, поскольку это антитело проявляло перекрестную реактивность к TIGIT мыши, а также связывание с TIGIT человека. Клетки предварительно инкубировали в течение 45 мин при 37°C с различными концентрациями анти-TIGIT антитела клона 26493 (от 0,03 до 10 мкг/мл) в 25 мкл полной среды (RPMI + 10% FBS). Клетки промывали один раз и инкубировали с 4 мкг/мл мышиного белка CD155-His-Fc метки (Thermo Fisher, 50259M03H50) в 50 мкл полной среды в течение 45 минут в инкубаторе. Клетки промывали один раз и окрашивали PE-анти-His-антителом (Biolegend, 362603) в течение 30 минут при 4°C. Ме-

дианную интенсивность флуоресценции (MFI), измеренную с помощью FACS, использовали в качестве меры связывания CD155 с Jurkat-mTIGIT. На фиг. 15A продемонстрирована кривая доза-ответ анти-TIGIT клона 26493 для конкуренции CD155, идентифицирующая 2,3 нМ как IC₅₀ (верхняя пунктирная линия представляет сигнал от изотипа, нижняя пунктирная линия - сигнал от клеток без CD 155). Эти результаты демонстрируют функциональную эффективность анти-TIGIT антитела для конкуренции с лигандом CD155 за TIGIT мыши.

В. Функциональный *in vitro* анализ мыши: антигенспецифическая цитотоксичность (OT-1).

Чтобы оценить антигенспецифическую цитотоксическую активность CD8⁺ Т-клеток OT-1 в отношении OVA-импульсных клеток-мишеней и влияние анти-TIGIT антител в этом анализе, клетки OT1 выделяли из селезенок C57BL/6-Tg^(TcrαTcrβ) 1100Mjb/Ctrl мыши (Charles River) путем механической диссоциации с последующей отрицательной селекцией Т-клеток мыши с использованием набора EasySep[™] для выделения Т-клеток мыши (Stemcell, Catalogue # 19851). В качестве антигенпрезентирующих клеток раковые клетки PanO2, которые естественным образом экспрессируют CD155, обрабатывали митомицином С (25 мкг/мл) и затем пульсировали с OVA-пептидом (S7951-1MG, Sigma Aldrich, 1 мкг/мл, 1 ч при 37°C). CD8⁺ Т-клетки и PanO2 совместно культивировали в течение 3 дней в присутствии анти-TIGIT клона 26493 или изотипического контроля при 133 нМ. В день 3 супернатант собирали для обнаружения ИФНγ с помощью ИФА (фиг. 15B) и Т-клеток для анализа цитотоксичности (фиг. 15C). В качестве клеток-мишеней использовали OVA-импульсные PanO2. Клетки-мишени и не импульсные PanO2 клетки (нецелевой внутренний контроль), 1×10⁶ каждая, были помечены CFSE (C1157, ThermoFisher) и Cell-Trace[™] Far Red набор для детекции пролиферации клеток (C34564, ThermoFisher) соответственно, в соответствии с инструкциями производителя. Эти клетки смешивали (соотношение 1:1) и высевали в количестве 2×10⁴ клеток на лунку. Стимулированные OT-1 CD8⁺ Т-клетки добавляли при 1×10⁵ клеток/лунка (эффекторные клетки), что приводило к соотношению эффектор/мишень 10:1 в присутствии анти-TIGIT клона 26493 или изотипического контроля при 133 нМ. Через 24 ч клетки промывали ФСБ и извлекали трипсинизацией. Затем клетки окрашивали набором для окрашивания живых/мертвых фиксируемых фиолетовым цветом мертвых клеток (Molecular Probes, L34955). Цитотоксическое уничтожение клеток-мишеней затем измеряли путем мониторинга изменения отношения живых клеток-мишеней к нецелевым клеткам с помощью проточной цитометрии.

На фиг. 15B продемонстрировано, что анти-TIGIT антитело увеличивает продукцию ИФНγ почти в 2 раза, тогда как на фиг. 15C продемонстрирована повышенная цитотоксическая активность OT-1 CD8⁺ Т-клеток мыши примерно на 60%. В целом эти результаты подтверждают функциональную активность анти-TIGIT антитела в отношении повышения эффекторной функции CD8⁺ Т-клеток мыши.

Пример 12. Противоопухолевая активность антагонистического анти-TIGIT антитела в монотерапии и в сочетании с анти-PD1 антителами на мышинной модели.

А. *In vivo* противоопухолевая активность антагонистических анти-TIGIT антител в монотерапии.

Для этого эксперимента анти-TIGIT клон 26493 продуцировали в клетках млекопитающих на изотипе IgG2a мыши. Самкам мышей Balb/c в течение 8 недель инокулировали подкожно 500 000 клеток CT26 рака толстой кишки (ATCC® CRL-2638[™]). На 9-й день после инокуляции, когда объемы опухолей были в среднем около 45 мм³, мышей рандомизировали в группах лечения с равным объемом опухоли (n=8 на группу). Мышей обрабатывали 200 мкг анти-TIGIT или изотипического контроля (mIgG2a, BioXcell) или 200 мкг анти-PD-1 (RMP1-14, BioXcell) и 200 мкг изотипического контроля (mIgG2a, BioXcell) или 200 мкг анти-PD-1 (RMP1-14, BioXcell) и различными концентрациями анти-TIGIT (200 мкг, 60 мкг, 20 мкг) путем внутрибрюшинных инъекций в день 9, день 12 и день 15. Рост опухолей контролировали, и объемы опухолей измеряли с помощью электрических штангенциркулей три раза в неделю с 9-го по 36-й день. Мышей умерщвляли, когда объем опухоли превышал 2000 мм³. Кривые роста опухоли статистически анализировали с помощью линейной смешанной модели. Различия между группами лечения оценивались путем тестирования взаимодействия времени*группы лечения. Чтобы проверить синергетический эффект между анти-TIGIT и анти-PD-1, группы лечения были перекодированы по комбинации двух переменных; анти-TIGIT (да/нет) и анти-PD-1 (да/нет). Синергетический эффект, в дополнение к аддитивному эффекту каждой обработки (анти-TIGIT*время и анти-PD-1*время), оценивали путем тестирования термина взаимодействия анти-TIGIT*анти-PD-1*время.

На фиг. 16A продемонстрированы срединные кривые роста опухоли на группу, а также индивидуальные кривые роста для мышей, получавших анти-TIGIT антитело в монотерапии. В то время как в контрольной группе ни у одной мыши не было регрессии опухоли, 2/8 мышей, получавших анти-TIGIT, имели полный ответ. У остальных мышей наблюдалась явная задержка роста опухоли. В контрольной группе ни одна мышь не доживала до 30 дней, тогда как в группе, получавшей лечение, 7/8 мышей жили более 30 дней.

На фиг. 16B продемонстрированы срединные кривые роста опухоли на группу, а также индивидуальные кривые роста для мышей, которые получали анти-PD1 в монотерапии или в комбинации с анти-TIGIT. Наблюдалось значительное подавление роста опухолей у мышей, получавших анти-TIGIT+ анти-PD-1 по сравнению с монотерапией анти-PD-1 (p<0,0001). Комбинация анти-TIGIT+анти-PD-1 достигла

синергетической противоопухолевой эффективности, которая была больше, чем аддитивный эффект обеих монотерапевтических процедур ($p=0,02$). Комбинация анти-TIGIT антител (при 200 мкг) и анти-PD1 антител привела к тому, что у 7/8 мышей наблюдался полный ответ. Противоопухолевая эффективность поддерживалась с помощью комбинации анти-PD1 и более низких доз анти-TIGIT, которые приводят к полному ответу у 8/8 мышей, когда анти-TIGIT антитело уменьшалось до 60 мкг, и у 5/8 мышей, когда анти-TIGIT антитело уменьшалось далее до 20 мкг (фиг. 16С). Эти данные демонстрируют значительную противоопухолевую эффективность анти-TIGIT терапии при монотерапии ($p<0,0001$) или в сочетании с анти-PD1 антителом ($p<0,0001$) для лечения предустановленных опухолей.

Пример 13. Изотип-зависимая противоопухолевая активность антагонистического анти-TIGIT антитела в монотерапии и комбинации с анти-PD1 антителами на мышинной модели.

Для этого эксперимента анти-TIGIT клон 26493 продуцировали в клетках млекопитающих на изотипе IgG2a мыши и IgG1 мыши. Самкам мышей Balb/c в течение 8 недель инокулировали подкожно 500000 клеток CT26 рака толстой кишки (ATCC® CRL-2638™). На 10-й день после инокуляции, когда объемы опухолей были в среднем около 100 мм³, мышей рандомизировали в группах лечения с равным объемом опухоли ($n=8$ на группу). Для оценки монотерапии мышам вводили 200 мкг анти-TIGIT или изотипического контроля (mIgG2a, BioXcell) путем внутрибрюшинных инъекций на 10, 13 и 16 день. Для оценки комбинации с анти-PD-1 мышей обрабатывали 200 мкг анти-PD-1 (RMP1-14, BioXcell) и 200 мкг изотипического контроля (mIgG2a, BioXcell) или комбинацией 200 мкг анти-PD-1. (RMP1-14, BioXcell) и 200 мкг анти-TIGIT путем внутрибрюшинных инъекций на 10, 13 и 16 день. Рост опухолей контролировали, и объемы опухолей измеряли с помощью электронных штангенциркулей три раза в неделю с 10-го по 33-й день. Мышей умерщвляли, когда объем опухоли превышал 2000 мм³.

На фиг. 17А продемонстрированы срединные кривые роста опухоли на группу, а также индивидуальные кривые роста для монотерапии анти-TIGIT антителом и на фиг. 17В для комбинированной терапии анти-TIGIT и анти-PD1 антителами. Как при монотерапии, так и в сочетании с анти-PD-1 лечение анти-TIGIT антителом приводило к значительной противоопухолевой эффективности при введении в качестве изотипа IgG2a мыши ($p=0,0001$ и $p=0,009$ соответственно). Однако противоопухолевая эффективность не может быть обнаружена с помощью анти-TIGIT в качестве изотипа IgG1 мыши, что позволяет предположить, что взаимодействие Fc-рецептора с mIgG2a важно для противоопухолевой активности антагонистических анти-TIGIT антител на мышинной модели CT26. Эти данные демонстрируют изотип-зависимую противоопухолевую эффективность анти-TIGIT терапии в монотерапии или комбинации для лечения предустановленных опухолей.

Пример 14. Характеристика механизма действия противоопухолевой активности *in vivo* антагонистического анти-TIGIT антитела.

А. Анализ проточной цитометрии селезенки и опухоли.

Чтобы исследовать *in vivo* способ действия антагонистического анти-TIGIT антитела, опухоли анализировали проточной цитометрией на наличие инфильтрата иммунных клеток после обработки анти-TIGIT антителом 26493 (IgG2a), в монотерапии и в комбинации с анти-PD-1. Мышей инокулировали и обрабатывали, как описано в примере 12. Через два дня после второй обработки, мышей (8 мышей в группе) умерщвляли и собирали опухоли. Опухоли диссоциировали с помощью набора для диссоциации опухоли (Miltenyi Biotec). Для прямого окрашивания *ex-vivo* клетки окрашивали анти-CD45, анти-CD4, анти-CD8 и анти-FoxP3 (все от eBioscience) после окрашивания прижизненным красителем (Molecular Probes, L34955) и Fc-блоком. Для стимуляции *ex vivo* клетки инкубировали с коктейлем для стимуляции клеток (eBioscience) и ингибитором транспорта белка (eBioscience) в течение 3 ч. За этим следовало окрашивание анти-CD4 и анти-CD8 антителами и Fc-блоком. После фиксации и пермеабиллизации коммерческими буферами (буфер фиксации IC и буфер пермеабиллизации) клетки окрашивали анти-ИЛ-10 и анти-ИФНγ (все от eBioscience). На всех фигурах продемонстрировано процентное изменение по сравнению с соответствующей контрольной группой (изотипический контроль для монотерапии, анти-PD-1 для комбинации), причем отрицательное значение представляет уменьшение, а положительное значение - увеличение по сравнению с контрольной группой.

На фиг. 18А продемонстрировано, что лечение опухоли *in vivo* анти-TIGIT антителом mIgG2a приводит к снижению доли регуляторных Т-клеток в популяции CD4⁺ TIL на 28% по сравнению с контрольной группой, что не наблюдается после лечения анти-TIGIT mIgG1. Это показывает, что происходит истощение клеток TIGIT⁺ Treg, что, возможно, объясняет дифференциальную эффективность двух изотипов, как обсуждалось в примере 14. На фиг. 18В продемонстрировано, что истощения CD8⁺ TIL не наблюдается, но вместо этого наблюдается небольшое увеличение для двух изотипов (увеличение на 17% по сравнению с контролем для mIgG1 и 16% для mIgG2a). Эти результаты в совокупности приводят к увеличению более чем на 50% отношения CD8/Treg в опухоли, обработанной анти-TIGIT mIgG2a (фиг. 18С). Функциональность внутриопухолевых Т-клеток также улучшается в группе, получавшей анти-TIGIT антитело mIgG2a, с сильным увеличением продукции ИФНγ как CD4⁺ (фиг. 18D), так и CD8⁺ TIL (фиг. 18Е). Это привело к сильному увеличению отношения клеток, продуцирующих ИФНγ, к клеткам, продуцирующим ИЛ-10, после стимуляции *ex vivo* в популяции CD4⁺ TIL/CD8⁺ (фиг. 18F).

На фиг. 18G продемонстрировано, что комбинирование анти-TIGIT mIgG2a с анти-PD-1 приводит к

снижению регуляторных Т-клеток на 33% по сравнению с монотерапией анти-PD-1. Опять же, для CD8⁺ Т-клеток верно обратное, с 22% и 28% увеличением инфильтрации CD8⁺ Т-клеток, соответственно для изотипов mIgG1 и mIgG2a, по сравнению с монотерапией анти-PD-1 (фиг. 18H). В совокупности это приводит к более чем двукратному увеличению отношения CD8⁺ TIL к Treg в опухоли для комбинации с анти-TIGIT mIgG2a (фиг. 18I). Кроме того, обработка анти-TIGIT антителом mIgG2a в сочетании с анти-PD-1 демонстрирует сдвиг Th1 по сравнению с Th2 фенотипом для внутриопухолевых CD4⁺ Т-клеток с заметным увеличением ИФНγ-продуцирующих CD4 клеток (фиг. 18J) и снижением ИЛ-10 продуцирующих CD4 клеток (фиг. 18K). Это привело к сильному увеличению клеток, продуцирующих ИФНγ/ИЛ-10, после стимуляции ex vivo в популяции CD4⁺ TIL по сравнению с мышами, получавшими анти-PD-1 в монотерапии (фиг. 18L).

Таблица 11

Дифференциально экспрессируемые гены между мышами, получавшими анти-TIGIT mIgG2a и носитель

Символ гена	Log2 изменения	кратного	Скорректированное р- значение
Ccr2	-1,29		0,0000668
Prf1	1,79		0,0000668
Ctsg	2,13		0,0000668
Ctla4	1,72		0,00309
Gzmb	1,51		0,00309
Ccl2	0,56		0,0174
Il2ra	1,61		0,0174
Cd55	1,64		0,0213
Il2rb	0,872		0,0379
Cd274	0,982		0,0385
Klrg1	1,3		0,0402
Icos	1,26		0,0402
Il1m	0,87		0,0402
Cx3cr1	-0,82		0,0428
C1ra	0,896		0,0428
Cd33	-0,906		0,0479
Ccl4	0,886		0,0518

Таблица 12

Дифференциально экспрессируемые гены между мышами, получавшими анти-TIGIT mIgG2a + анти-PD-1 и анти-PD1

Символ гена	Log2 изменения	кратного	Скорректированное р- значение
Ctsg	2,34		0,0000375
Prf1	1,69		0,000255
Gzmb	1,71		0,000766

Cd55	2,08	0,00131
Entpd1	0,839	0,00131
Klrg1	1,76	0,00132
Itga1	0,874	0,0017
Ctla4	1,72	0,00173
Il2ra	1,82	0,00237
Itgb3	0,863	0,00237
Slc11a1	0,849	0,00329
Cd36	1,44	0,0049
Cd180	0,899	0,00602
Icam1	0,893	0,00802
Cd274	1,06	0,00993
Cd40	0,926	0,0113
Eomes	1,28	0,0113
Abcg1	0,869	0,0113
Ccr2	-0,781	0,0122
Thy1	0,868	0,0165
Ccl2	0,501	0,0203
Gbp5	1,12	0,0216
Icos	1,24	0,0263
Tgfr2	0,458	0,0278
H2 K1	0,292	0,0307
Sh2d1a	0,999	0,0307
Il2rb	0,808	0,0307
Selplg	0,64	0,031
Bst1	0,702	0,0317
Cd247	1	0,032
Irf8	0,699	0,0365
Il21r	0,899	0,0392
Gbp2b	1,11	0,0392
Stat1	0,865	0,0427
C4b	0,922	0,0428
Abca1	0,537	0,044
Trem2	0,482	0,0454

В. Транскриптомный анализ опухоли с помощью NanoString.

Чтобы исследовать *in vivo* способ действия анти-TIGIT антитела, инфильтрат иммунных клеток опухолей, обработанных анти-TIGIT, в монотерапии и в комбинации с анти-PD-1, анализировали с помощью транскриптомного анализа (Nanostring). Мышей инокулировали и обрабатывали, как описано в примере 12. Через два дня после третьей обработки анти-TIGIT и/или анти-PD1 антителами мышей умерщвляли и собирали опухоли. РНК выделяли, а экспрессию селекции из 770 генов, вовлеченных в иммунологию рака, непосредственно количественно определяли с помощью технологии nCounter (панель PanCancer Immune Profiling, Nanostring; выполнена VIB Nucleomics Core). Данные были проанализированы с помощью программного обеспечения nSolver (Nanostring).

На фиг. 19А продемонстрирована диаграмма рассеяния (volcano plot) генов, которые дифференцированно регулируются между мышами, обработанными носителем, и мышами, обработанными анти-TIGIT mIgG2a. Высоко статистически значимые гены попадают в верхнюю часть графика, а высокодифференциально экспрессируемые гены оказываются с обеих сторон (слева: пониженная регуляция у мышшей, обработанных анти-TIGIT, справа: повышенная регуляция у мышшей, обработанных анти-TIGIT). Примеры сильно активированных генов включают перфорин, гранзим В и CTLA-4. Сплошная линия представляет не скорректированное р-значение 0,01, пунктирная линия скорректированное р-значение 0,05 (поправка Бенджамини-Хохберга). В табл. 11, в табл. 12 продемонстрированы гены, которые были достоверно дифференцированно экспрессированы для анти-TIGIT mIgG2a по сравнению с носителем и с aPD-1+анти-TIGIT mIgG2a по сравнению с анти-PD1 соответственно. Когда несколько генов были сум-

мированы в баллах для функциональных подмножеств иммунных клеток, наиболее поразительным открытием было увеличение цитотоксических клеток и CD8⁺ Т-клеток (фиг. 19В). Те же самые изменения присутствовали у мышей, получавших анти-PD-1 + анти-TIGIT mIgG2a по сравнению с только анти-PD-1. Никаких изменений не наблюдалось у мышей, получавших анти-TIGIT mIgG1, в монотерапии или в комбинации с анти-PD-1.

В целом, эти результаты демонстрируют, что противоопухолевая эффективность, наблюдаемая после лечения *in vivo* анти-TIGIT антителом, опосредована снижением Трег-инфильтрата в опухоли, в то время как популяция эффекторных Т-клеток CD8⁺ увеличивается. Кроме того, эффекторная функция CD4⁺ и CD8⁺ TIL повышена, о чем свидетельствует более высокая доля клеток, продуцирующих ИФНγ, сдвиг в сторону ответа Th1 и повышенная экспрессия генов, важных для цитотоксических функций Т-клеток.

Пример 15. Активность антитело-зависимой клеточной токсичности (АЗКЦ), индуцированная антигоницистическими анти-TIGIT антителами.

А. *In vitro* АЗКЦ на МКПК человека от здоровых доноров.

Изолированные МКПК от здоровых человеческих доноров ресуспендировали в полной среде RPMI (дополненной 10% FBS, инактивированной нагреванием + 50ЕД пеницилина + 50ЕД стрептомицина и дополненной 200 ЕД ИЛ-2/мл). 2,5×10⁵ МКПК человека были распределены на лунку в 96-луночном планшете. Клон 26452 анти-TIGIT антитела человека, продуцируемый в клетках млекопитающих, или изотипический контроль IgG1 (Biolegend, 403102) добавляли в конечной концентрации 66,6; 0,66 и 0,006 нМ для каждой соответствующей лунки. Клетки инкубировали в течение 20 ч при 37°C с 5% CO₂. Затем клетки собирали и окрашивали следующей панелью антител: LVD efluor 520 (eBioscience 65-0867-14), анти-TCRab-PercP-Cy5.5 (клон IP26, Biolegend 306723), анти-CD4-BV510 (клон SK3, BD Horizon 562970), анти-CD8-APC-Cy7 (клон SK1, Biolegend 344714), анти-CD25-BV605 (клон 2A3, Biolegend 562660), анти-CD127-APC (A019D5, Biolegend 351316), анти-CCR7-BV421 (клон G043H7, Biolegend 353207) и анти-CD45RO⁺ PE-Cy7 (клон UCHL1, Biolegend 304229). Результаты представлены на стробированных живых клетках. CD45⁺CD4⁺ или CD45⁺CD8⁺ представляют общее количество CD4⁺ или CD8⁺ Т-клеток. Клетки CD45⁺RO⁺CD4⁺ или CD45⁺RO⁺CD8⁺ представляют собой CD4⁺ или CD8⁺ Т-клетки памяти, тогда как CD25^{высокий}CD127^{низкий}CD4⁺ представляют собой Трег клетки. Доля TIGIT⁺ клеток в стробированных Tregs выше, чем в стробированных CD8⁺ Т-клетках памяти и CD4⁺ Т-клетках, как продемонстрировано на фиг. 20А.

Абсолютное количественное определение выполняется с использованием шариков AccuCheck Counting (Life technologies) в соответствии с инструкциями производителя. После расчета абсолютного количества клеток на мкл, % специфического лизиса рассчитывают по следующей формуле = (1 - (абсолютное количество клеток на мкл на образце, обработанном антителом TIGIT 26452/среднем значении в трех повторностях, не обработанном антителом))×100. Как продемонстрировано на фиг. 20В, анти-TIGIT антитело 26452 hIgG1 запускает более высокий специфический лизис на Трег (62,22%), чем на общих CD8⁺ Т-клетках (12,2%) или общих CD4⁺ Т-клетках (16,36%).

В. *Ex-vivo* АЗКЦ на опухоли мыши.

Чтобы подтвердить, что анти-TIGIT мышинное антитело IgG2a может истощать TIGIT⁺ регуляторные Т-клетки, был проведен анализ АЗКЦ *ex-vivo*. Самкам мышей Balb/c в течение 8 недель инокулировали подкожно 500000 клеток рака толстой кишки CT26 (ATCC® CRL-2638™). Через три недели после инокуляции, опухоли собирали и диссоциировали с помощью набора для диссоциации опухоли (Miltenyi Biotec). Суспензию отдельных клеток инкубировали с 133 нМ анти-TIGIT антитела 26493 (изотип mIgG1 или mIgG2a) в течение 20 ч (1 миллион клеток/200 мкл в RPMI + 10% FBS). Через 20 часов клетки окрашивали анти-CD4 антителами, анти-TIGIT, анти-CD8 и анти-FoxP3 (все из eBioscience) после окрашивания прижизненным красителем (Molecular Probes, L34955) и Fc-блоком.

На фиг. 21 показан % снижения абсолютного числа клеток TIGIT⁺ по сравнению с лечением с изотипическим контролем для различных подмножеств TIGIT⁺. Наибольшее снижение после обработки анти-TIGIT антителом mIgG2a наблюдается в регуляторных Т-клетках (снижение примерно на 40%), что позволяет предположить, что эти клетки более восприимчивы к АЗКЦ, чем обычные CD4⁺ или CD8⁺ Т-клетки.

В целом, эти результаты демонстрируют эффективность анти-TIGIT hIgG1 или mIgG2a для истощения иммунных клеток TIGIT⁺ с более высокой активностью, продемонстрированной в популяции Трег.

Пример 16. Прогнозирование иммуногенности с использованием анализа *in silico*.

Иммуногенный потенциал клонов 29494 и 29489, а также его варианта 31282 оценивали с помощью *in silico* прогноза с использованием EpiMatrix Protein Score (De Groot et al. (2009) Clinical Immunol. 131:189.). Чтобы завершить анализ, входные последовательности были проанализированы в перекрывающихся 9-мерных рамках, и каждая рамка была оценена относительно панели из восьми общих аллелей HLA класса II. Эти аллели являются "супертипами". Каждый из них функционально эквивалентен или почти эквивалентен многим дополнительным аллелям "члена семьи". Взятые вместе, эти восемь ал-

лелей супертипа вместе с членами их семей "охватывают" более 95% человеческой популяции (Southwood et al. (1998) *J. Immunol.* 160:3363). Каждая "оценка-по-аллелю" является утверждением о предсказанной аффинности связывания HLA. Оценочные баллы EpiMatrix варьируются от -3 до +3 и распределяются нормально. Оценочные баллы EpiMatrix выше 1,64 определяются как "попадания"; то есть потенциально иммуногенные и заслуживающие дальнейшего рассмотрения.

При прочих равных факторах, чем больше лигандов HLA (т.е. попаданий EpiMatrix) содержится в данном белке, тем больше вероятность того, что этот белок вызовет иммунный ответ. EpiMatrix оценка белка - это разница между числом предсказанных Т-клеточных эпитопов, которые, как ожидается, будут обнаружены в белке данного размера, и числом предполагаемых эпитопов, предсказанных системой EpiMatrix. EpiMatrix оценка белка коррелирует с наблюдаемой иммуногенностью. EpiMatrix оценки белка "нормализованы" и могут быть нанесены на график в стандартизированной шкале. Оценка белка EpiMatrix для "среднего" белка равна нулю. EpiMatrix оценки белка выше нуля указывают на наличие избыточных лигандов МНС и указывают на более высокий потенциал иммуногенности, в то время как оценки ниже нуля указывают на наличие меньшего количества потенциальных лигандов МНС, чем ожидалось, и более низкий потенциал иммуногенности. Считается, что белки с баллом выше +20 обладают значительным иммуногенным потенциалом.

Поправка на наличие регуляторных Т-клеточных эпитопов.

Антитела являются уникальными белками в том смысле, что аминокислотные последовательности их вариабельных доменов, особенно их определяющих комплементарность участков (CDR), могут варьировать в необычайной степени. Именно эта изменчивость позволяет антителам распознавать широкий спектр антигенов. Однако события рекомбинации и мутации, которые контролируют созревание антител, также могут приводить к появлению новых или неоэпитопов Т-клеток. Эти неоэпитопы могут казаться "чужими" по отношению к циркулирующим Т-клеткам. Присутствие неоэпитопов в последовательностях антител может привести к формированию ответа антител человек-против-человека; также известный как ответ НАНА или ADA (анти-лекарственные антитела).

Регуляторные Т-клетки играют важную роль в подавлении иммунных ответов на полностью человеческие белки на периферии, включая те, которые содержат мутированные и/или высоко вариабельные последовательности, такие как CDR антител. Регуляторные Т-клетки вовлекаются и активируются эпитопами регуляторных Т-клеток. Присущий риск, связанный с присутствием неоэпитопов в последовательностях антител, по-видимому, компенсируется присутствием встречающихся в природе эпитопов регуляторных Т-клеток.

Посредством скрининга последовательностей многих изолятов антител человека, EpiVax идентифицировал несколько высококонсервативных лигандов HLA, которые, как полагают, обладают регуляторным потенциалом. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что многие из этих пептидов, на самом деле, активно толерогенны у большинства субъектов. Эти высококонсервативные, регуляторные и разнородные Т-клеточные эпитопы в данное время известны как Tregitopes (De Groot et al. (2008) *Blood* 112: 3303)

Во многих случаях иммуногенный потенциал неоэпитопов, содержащихся в гуманизированных антителах, можно эффективно контролировать в присутствии значительного количества Tregitope. Для целей анализа иммуногенности антител, EpiVax разработал скорректированный по Tregitope показатель EpiMatrix и соответствующий прогноз противотерапевтического ответа антител. Чтобы рассчитать показатель EpiMatrix с поправкой на Tregitope, оценки Tregitope вычитают из показателя белка EpiMatrix. Показано, что скорректированные по Tregitope оценки хорошо коррелируют с наблюдаемым клиническим иммунным ответом для набора из 23 коммерческих антител (De Groot et al. (2009) *Clinical Immunol.* 131:189).

Последовательности антител клонов 29489, 29494 и 31282 оцениваются по нижнему краю шкалы EpiMatrix, что указывает на ограниченный потенциал иммуногенности. Регрессионный анализ лицензированных моноклональных антител предсказывает ответ ADA у ~0% пациентов, подвергшихся воздействию антител клонов 29489 и 31282. Для клона 29494 анализ предсказывает ответ ADA у 2,78% пациентов, подвергшихся воздействию, для базовой последовательности VH и 2,88% для варианта последовательности VH. Данные приведены в табл. 13 ниже.

Таблица 13

EpiMatrix и Tregitope скорректированные EpiMatrix оценки

Входящая последовательность	Длина	Оценки	EpiMatrix хиты	Оценка EpiMatrix	Оценка EpiMatrix с поправкой на Tregitope
29489_VH	121	904	40	-19.41	-47.26
29489_VL	108	800	39	-17.58	-51.75
31282_VH	121	904	40	-19.41	-47.26
31282_VL	108	800	39	-17.58	-51.75
29494_VH	125	936	54	2.68	-7.18
29494_VL	107	792	40	-12.2	-38.83

Пример 17. Определение аффинности связывания анти-TIGIT клонов с рекомбинантным белком TIGIT человека.

Антитело 31282 сравнивали с клонами анти-TIGIT антител, описанными в других патентных заявках. В частности, 31282 сравнивался с: 4.1D3.Q1E (также упоминается как 4.1D3 из WO 2017/053748); 22G2 (из WO 2016106302); 31C6 (из WO 2016/028656); 313M2 (из WO 2016/191643); и TIG1 (из WO 2017/152088). Ссылки и последовательности сравниваемых клонов антител продемонстрированы в табл. 14 ниже:

Таблица 14

Последовательности доменов VH и VL сравнительных анти-TIGIT антител

Клон а-TIGIT	Ссылки	Последовательность
4.1D3.Q1E	VH: SEQ ID NO: 34 из WO2017/053748 VL: SEQ ID NO: 36 из	последовательность VH: EVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLE WLGKTYRFBKWDYAVSVKGRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTA VFYCTRESTTYDLLAGPFDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 343 в данном документе)

	WO2017/05 3748	последовательность VL: DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQTVLYSSNNKKYLAWYQQKPG QPPNLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFLTITSSLAEDVAVYYCQ QYYSTPFTFGPGTKVEIK (SEQ ID NO: 344 в данном документе)
22G2	VH: SEQ ID NO:7 из WO2016/10 6302 VL: SEQ ID NO:9 из WO2016/10 6302	последовательность VH: QVHLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSVSSGIYYWSWIRPPGKGLE WIGYIYSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYY CARDYYVSGNYNVDYFFGVDVWGQTTVTVSS (SEQ ID NO: 345 в данном документе) последовательность VL: EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIY DASNRATGIPARFSGSGSGTDFLTITSSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPLF TFGPGTKVDIK (SEQ ID NO: 346 в данном документе)
31C6 (MEB125.3 1C6.A1.205 VH4/VL1)	VH: SEQ ID NO:127 из WO2016/02 8656 VL: SEQ ID NO:130 из WO2016/02 8656	последовательность VH: EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFSSYVMHWVRQAPGGGLE WIGYIDPYNDGAKYAQKFQGRVTLTSDKSTSTVYMELSSLRSEDTAV YYCARGGPGYGWYFDVWGQTTVTVSS (SEQ ID NO: 347 в данном документе) последовательность VL: DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASEHIYSYLSWYQQKPGKAPKLLIY NAKTLAEGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQHHFGSPLTF GQGRLEIK (SEQ ID NO: 348 в данном документе)
313M32	VH: SEQ ID NO:67 из WO2016/19 1643 VL: SEQ ID NO:68 из WO2016/19 1643	последовательность VH: QVQLQESGPGLVKPSSETLSLCAVSGYSITSDYAWNWRQPPGKGLE WIGYISYSGSTSYNPSLSRVRTISRDTSKNQFFLKLSSVTAADTAVYYC ARRQVGLGFAYWGQTLVTVSS (SEQ ID NO: 349 в данном документе) последовательность VL: DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLI YSASYRYTGVPVSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDIATYYCQHHYSTPWT FG (SEQ ID NO: 350 в данном документе)
TIG1	VH: SEQ ID NO:10 из WO2017/15 2088 VL: SEQ ID NO:14 из	последовательность VH: DVQLVESGGGLVQPGRKLSAASGFTFSNFGMHWVRQAPEKGLLE WVAFISSGSSSIYYADTVKGRFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDTAMY YCARMLDYYAMDYWGQTSVTVSS (SEQ ID NO: 351 в данном документе) последовательность VL: DVQITQSPSYLAASPGETITINCRASKSISKYLAWYQEKPGKTNKLLIYS
	WO2017/15 2088	GSTLQSGIPSRFSGSGSGTDFLTITSSLEPEDFAMYYCQHHNEYPWTFG GGTKLEIK (SEQ ID NO: 352 в данном документе)

А. Получение в клетках млекопитающих.

Для получения достаточного количества отобранных клонов а-TIGIT для дальнейшей характеристики были созданы ДНК-векторы, кодирующие клоны специфических антител (клоны 31282_up, 4.1D3, 22G2, 31C6, 313M32 и TIG1) и трансдуцированные в НЕК клетки для продукции изотипа IgG1 человека. Оптимизированные по кодонам фрагменты синтетической ДНК человека для переменных доменов антител были заказаны в Geneart. Последовательности переменного домена плавно лигировали в векторы экспрессии рUPE, содержащие сигнальную последовательность мышиногo Igкаппа и константные участки соответствующего класса антител. Векторы экспрессии были подтверждены рестрикционным анализом и секвенированием ДНК. Для транзientной трансфекции были получены тахирепс ДНК, не содер-

жащие эндотоксина (Sigma), и векторы тяжелой и легкой цепи были совместно трансфицированы в клетки HEK293EBNA1 в среде Freestyle (ThermoFisherScientific) в соответствии с установленными протоколами. Приматон (0,55% конечного объема) добавляли через 24 часа после трансфекции. Кондиционированную среду собирали через 6 дней после трансфекции. Антитела очищали с помощью периодических процессов аффинной хроматографией Mabselect sureLX (GE Healthcare). Связанные антитела промывали в 2 этапа ФСБ, содержащим 1М NaCl и ФСБ. Антитела элюировали 20 мМ цитратом, 150 мМ NaCl, pH 3, и нейтрализовали до приблизительно pH 7 с 1/6 объема 1 М K_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH 8.

Затем антитела дополнительно очищали гель-фильтрацией с использованием колонки Superdex200, уравновешенной в ФСБ. Фракции анализировали с помощью NuPAGE и фракции, содержащие антитела, объединяли. Конечные продукты стерилизовали через 0,22 мкМ шприцевой фильтр. Продукт анализировали с помощью NuPAGE, а уровни эндотоксина измеряли с помощью LAL-анализа.

Кроме того, клон 31282 был также продуцирован в клетке CHO-K1, как описано ниже (клон 31282_wu) на изоформе IgG1 или IgG4. ДНК-векторы, кодирующие антитела, конструировали и трансфицировали в клетки CHO-K1. CHO кодон оптимизированные фрагменты ДНК для вариабельных доменов антител были синтезированы и лигированы в векторы экспрессии, содержащие сигнальную последовательность и константные участки соответствующего класса антител. Векторы экспрессии были подтверждены рестрикционным анализом и секвенированием ДНК. Векторы тяжелой и легкой цепи совместно трансфицировали в клетки CHO-K1 путем электропорации (Bio-rad) в соответствии с установленными протоколами. Трансфицированные культуры масштабировали и инокулировали в культуры с подпиткой. Кондиционированную среду собирали через 14 дней культур с подпиткой.

Собранную клеточную культуру сначала осветляли двумя этапами глубокой фильтрации с последовательным соединением D0HCi A1HC (Millipore). Затем осветленный сбор сначала очищали аффинной хроматографией с MabSelect SuRe (GE Healthcare). Связанные антитела промывали в 2 этапа 50 мМ NaAc-HAc (pH 5,5), содержащим 1 М NaCl и 50 мМ NaAc-HAc (pH 5,5). Затем антитела элюировали 50 мМ NaAc-HAc (pH 3,5) и нейтрализовали до приблизительно pH 5,5 с помощью 1 М Трис-HCl (pH 9,0).

Затем нейтрализованное промежуточное соединение дополнительно полировали с помощью анионообменной хроматографии (AEX) с использованием POROS HQ50 (Life Tech) в режиме проточного потока. Колонку уравновешивали 50 мМ NaAc-HAc (pH 5,5) перед загрузкой. Поток AEX, собранный во время стадии загрузки и восстановления, дополнительно полировали катионообменной хроматографией (CEX) в режиме связывания-элюирования с использованием POROS XS (Life Tech.). Колонку CEX уравновешивали в 50 мМ NaAc-HAc (pH 5,5), и антитела элюировали линейным градиентным элюированием (LGE), чтобы достичь 50 мМ NaAc-HAc (pH 5,5), содержащего 0,5 М NaCl в 10 CV. Конечную ультрафильтрацию и диафильтрацию (UF/DF) с использованием Pellicon 3, ultracel 30 кДа, типа А (Millipore) проводили для концентрирования элюата CEX и буфера обмена в 20 мМ His-HCl (pH 5,5). После этого в диафильтрованный образец добавляли полисорбат 80 (PS80) и сахарозу для получения конечного продукта, концентрация которого составляла приблизительно 20 г/л, в буфере 20 мМ His-HCl, 0,01% (мас./мас.) PS 80 и 9% (масса/объем) сахарозы (pH 5,5). Продукт прошел все тесты PQA. Чистота SEC, уровень эндотоксина и другие критерии соответствовали требованию.

В. Измерение Viacore.

Биосенсорный анализ проводили при 25°C в буферной системе HBS-EP (10 мМ HEPES, pH 7,3, 150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,05% Твин 20) с использованием технологии Viacore T200, сенсорного чипа CM5 (запущен в Novalix, Франция). Образец отеля выдерживали при 8°C. Козлиное антитело против человеческого IgG (специфичное для Fcy-фрагмента, Jackson ImmunoResearch Laboratories) иммобилизовали (10000 RU) в обеих проточных ячейках сенсорного чипа с использованием стандартной химии сочетания аминов. Этот тип поверхности обеспечивал формат для воспроизводимого захвата свежего аналитического антитела после каждой стадии регенерации. Проточную ячейку 2 использовали для анализа захваченного антитела, тогда как проточную ячейку 1 использовали в качестве контрольной проточной ячейки. В рабочем буфере готовили 6 различных концентраций антигена в диапазоне от 30 до 0,123 нМ. Каждую из концентраций образца антигена запускали как один повтор, за исключением запуска 3,33 нМ в двух экземплярах. Также были запущены две пустые (буферные) инъекции, которые использовались для оценки и вычитания артефактов системы. Фазы ассоциации (300 с) и диссоциации (600 с) для всех концентраций антигена проводили при скорости потока 30 мкл/мин. Поверхность регенерировали с помощью трех последовательных инъекций (15 с, 15 с и 60 с) 10 мМ глицина-HCl, pH 1,5. Полученные сенсограммы были согласованы в глобальном масштабе с моделью 1:1 (при условии, что кинетические значения одинаковы для всех применяемых концентраций). Аффинность также определяли по устойчивому состоянию для клона 313M32, так как подбор кинетической модели 1:1 не был надежным, показывая равновесие с TIGIT человека в конце времени ассоциации. Результаты, полученные для разных клонов a-TIGIT, приведены в табл. 15.

Оценка кинетики и аффинности

Клон	Кинетическая модель 1:1 связывания				Модель устойчивого состояния	
	Ka (1/с)	Kd (1/с)	Ka (нМ)	Rmax (RU)	Ka (нМ)	Rmax (RU)
31282_wu	3,86 ⁺⁰⁶	4,62 ⁻⁰⁴	0,120	16,7		
31282_up	3,70 ⁺⁰⁶	4,75 ⁻⁰⁴	0,128	15,3		
4.1D3	1,07 ⁺⁰⁶	4,72 ⁻⁰⁵	0,044	14,4		
22G2	2,51 ⁺⁰⁶	1,78 ⁻⁰⁴	0,071	11,1		
31C6	3,10 ⁺⁰⁶	2,09 ⁻⁰⁴	0,067	16,7		
313M32	па	па	па	па	10,1	17,2
TIG1	5,24 ⁺⁰⁶	1,31 ⁻⁰²	2,49	11,1		

Пример 18. Клеточное связывание антагонистических анти-TIGIT антител.

А. Связывание анти-TIGIT клонов с Jurkat-hTIGIT.

Аффинность человеческих анти-TIGIT антител измеряли с использованием клеток Jurkat Е6.1, трансдуцированных с помощью TIGIT человека (Jurkat hTIGIT). Чтобы проанализировать аффинность выбранных антител к hTIGIT, 10⁵ клеток распределяли на лунку и инкубировали с уменьшающейся концентрацией (8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,062; 0,031; 0,016; 8×10⁻³ и 4×10⁻³ нМ) различных клонов анти-TIGIT антител-антагонистов (фиг. 2). Антитела инкубировали с клетками в течение 20 мин при 4°С в буфере FACS. После отмывки клетки инкубировали с анти-человеческим Ig (специфичным для Fc-гамма)-PE (eBioscience, 12-4998-82, при 2,5 мкг/мл) в течение 20 минут на льду и дважды промывали. Интенсивность флуоресценции анализировали с использованием LSR BD Fortessa, и связывание клеток регистрировали как среднюю интенсивность флуоресценции PE в клетках, экспрессирующих TIGIT на их поверхности.

Полумаксимальную концентрацию связывания (EC₅₀) с Jurkat-hTIGIT рассчитывали с использованием уравнения с четырьмя переменными в форме кривой в Prism. Результаты продемонстрированы на фиг. 22А, а значения приведены в табл. 16 ниже. Значения EC₅₀ для связывания Jurkat-hTIGIT очень близки для клона 31282 без заметной разницы между антителом, продуцируемым в клетках НЕК (31282, 0,13 нМ) или в клетках СНО-К1 (31282 мкВ, 0,10 нМ). Клоны 31C6 и TIG1 также показывают значения EC₅₀ ниже 0,2 нМ, в то время как сродство к другим клонам (4.1D3, 22G2 и 313M32) ниже, а результаты показывают значения EC₅₀ в диапазоне от 0,267 до 0,445 нМ. Результаты демонстрируют сильное связывание с экспрессируемым мембраной TIGIT человека в сконструированной системе для анти-TIGIT клонов 31282, 31C6 и TIG1, в то время как другие клоны имеют более низкую аффинность.

Таблица 16

Данные EC₅₀ и сравнение различных клонов а-TIGIT для связывания с Jurkat-hTIGIT

Клон	EC ₅₀ связывания с Jurkat-hTIGIT (в нМ)	Кратное изменение EC ₅₀ на EC ₅₀ лучшего клона (31282_wu)
31282_wu	0,10	1
31282_up	0,13	1,3
313M32	0,44	4,2
4.1D3	0,27	2,5
22G2	0,32	3,0
31C6	0,13	1,2
TIG1	0,17	1,6

В. Связывание анти-TIGIT клонов с первичными CD8⁺ Т-клетками от МКПК здоровых людей.

Изолированные человеческие МКПК от здоровых добровольцев анализировали на связывание с помощью анти-TIGIT антител-антагонистов. Клетки распределяли по 1×10⁵ клеток на лунку. Клетки инкубировали с анти-CD16 (клон 3G8, BioLegend 302002), CD32 (клон FL18.26, BD Bioscience 557333) и CD64 (BD Bioscience 555525) при комнатной температуре в течение 10 минут, и указанные клоны анти-

человеческого TIGIT антитела были непосредственно добавлены в конечной концентрации 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,062; 0,031; 0,016; 8×10^{-3} и 4×10^{-3} нМ в буфере FACS и инкубируют в течение 20 мин при 4°C. После отмывки клетки инкубировали с анти-человеческим Ig (Fc-гамма-специфическим)-PE (eBioscience, 12-4998-82, при 2,5 мкг/мл) в течение 20 мин при 4°C. Затем клетки промывали и инкубировали со следующими антителами и смесью LVD: анти-CD4-PercP-Cy5.5 (клон A161A1, BioLegend 357414); анти-CD8-BV510 (клон SK1, BD Bioscience 563919) и LVD efluor 660 (eBioscience 65-0864-18).

Значения EC_{50} для связывания с первичными $CD8^+$ Т-клетками человека рассчитывали с использованием сигнала MFI на живых TIGIT⁺ $CD8^+$ Т-клетках. Результаты проиллюстрированы на фиг. 22В, а концентраций EC_{50} приведены в табл. 17 ниже. Значения EC_{50} для связывания первичных $CD8^+$ Т-клеток человека очень близки для клона 31282 без заметного различия между антителом, продуцируемым в клетках НЕК (31282_up, 0,21 нМ) или в клетках СНО-К1 (31282_wu, 0,19 нМ). Сравнение между различными клонами а-TIGIT антител-антагонистов показывает наилучшее значение EC_{50} для связывания с первичными $CD8^+$ Т-клетками человека для клона 31282_wu (0,19 нМ) и клона 31282_up (0,21 нМ). Клоны 31С6 и TIG1 показывают разницу в EC_{50} в 2 раза, тогда как клоны 22G2, 313M32 и 4.1D3 отличаются в 6,1-9,7 раза. В целом, 31282_wu и 31282_up показывают лучшее связывание с экспрессируемым мембраной TIGIT на первичных $CD8^+$ Т-клетках человека.

Таблица 17

Данные EC_{50} и сравнение различных а-TIGIT клонов для связывания с первичными $CD8^+$ Т-клетками человека

Клон	EC_{50} концентрации для связывания с $CD8^+$ Т-клетками (в нМ)	Кратное изменение EC_{50} на EC_{50} лучшего клона (31282_wu)
31282_wu	0,19	1
31282_up	0,21	1,1
313M32	1,45	7,5
4.1D3	1,88	9,7
22G2	1,17	6,1
31С6	0,39	2,0
TIG1	0,38	2,0

С. Связывание анти-TIGIT клонов с первичными $CD8^+$ Т-клетками от МКПК больных раком.

Изолированные человеческие МКПК от больных раком анализировали на связывание с различными клонами анти-TIGIT антител-антагонистов. Клетки распределяли по 1×10^5 клеток на лунку. Клетки инкубировали с анти-CD16 (клон 3G8, BioLegend 302002), CD32 (клон FLI8.26, BD Bioscience 557333) и CD64 (BD Bioscience 555525) при комнатной температуре в течение 10 мин, и указанные анти-TIGIT антитела человека были непосредственно добавлены в конечной концентрации: 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,062 и 0,031 нМ в буфере FACS и инкубируют в течение 20 мин при 4°C. После отмывки клетки инкубировали с анти-человеческим Ig (Fc-гамма-специфическим)-PE (eBioscience, 12-4998-82, при 2,5 мкг/мл) в течение 20 мин при 4°C. Затем клетки промывали и инкубировали со следующими антителами и смесью прижизненных красителей (LVD): анти-CD4-PercP-Cy5.5 (клон A161A1, BioLegend 357414); анти-CD8-BV510 (клон SK1, BD Bioscience 563919) и LVD efluor 520 (eBioscience 65-0867-14). Клетки промывали и фиксировали, а окрашивание поверхности определяли количественно с использованием BD LSR Fortessa. Данные проточной цитометрии анализировали с использованием FlowJo V10.1. TIGIT MFI на стробированных клетках LVD-TIGIT⁺ $CD8^+$ использовали для расчета значений EC_{50} . Кривые нелинейной регрессии продемонстрированы на фиг. 22С, а значения приведены в табл. 18 ниже.

Клоны 31282_wu и 31282_up показывают очень близкое значение EC_{50} для связывания с $CD8^+$ Т-клетками от пациентов больных раком с концентрацией 0,14 и 0,12 нМ, соответственно. Остальные клоны проявляют более низкую аффинность с клонами 31С6, TIG1 и 22G2, демонстрируя в 1,5, 2,7 и 3,1 раза более низкую аффинность, соответственно. Измеренное значение EC_{50} для клона 313M32 в 8,3 раза ниже по сравнению с клоном 31282_up. Клон 4.1D3 демонстрирует самую низкую аффинность, связываясь с разницей в 9,5 раз с лучшим протестированным клоном.

Таблица 18

Данные EC_{50} и сравнение различных α -TIGIT клонов для связывания с первичными $CD8^+$ Т-клетками от больных раком пациентов

Клон	Значение EC_{50} для связывания $CD8^+$ Т-клеток (в нМ)	Кратное изменение EC_{50} на EC_{50} лучшего клона (31282)
31282_wu	0,14	1,2
31282_up	0,12	1,0
313M32	1,0	8,3
4.1D3	1,15	9,5
22G2	0,37	3,1
31C6	0,18	1,5
TIG1	0,33	2,7

Пример 19. Анализ конкуренции между клонами анти-TIGIT антител-антагонистов и природным лигандом TIGIT (CD155).

Клетки Jurkat со сверхэкспрессией TIGIT человека (Jurkat-hTIGIT) собирали и распределяли по 5×10^4 клеток/лунка и инкубировали с анти-TIGIT антителами человека в следующих концентрациях: 133,33; 42,20; 13,33; 4,22; 1,33; 0,422; 0,133; 0,042; 0,0133; $4,2 \times 10^{-3}$; $1,3 \times 10^{-3}$; $4,2 \times 10^{-4}$; $1,3 \times 10^{-4}$; $4,2 \times 10^{-5}$ нМ в полной среде в течение 45 мин при 37°C. Избыток антител промывали, а затем клетки инкубировали с CD155-His при 15 мкг/мл (Creative Biomart, PVR-3141H) в течение 45 минут при 37°C. Затем связанный CD155-His детектировали с использованием анти-His-метки-PE (Biolegend, 362603, 2 мкл на тест), инкубировали в течение 30 мин при 4°C. Клетки анализировали с помощью FACS с использованием BD LSRFortessa, и половинной концентрации (IC_{50}), которая предотвращает связывание CD155, рассчитывали на основе средней интенсивности флуоресценции PE в общих клетках.

Результаты продемонстрированы на фиг. 23, а значения приведены в табл. 19 ниже. Клоны анти-TIGIT 31282_wu и 31282_up показывают лучшие значения IC_{50} для конкуренции CD155 на клетках Jurkat, сконструированных для экспрессии hTIGIT с концентрациями 0,05 и 0,04 нМ соответственно. Другие клоны (4.1D3, 22G2, 31C6, TIG1) имеют значения IC_{50} от 0,07 до 0,09 нМ, в то время как клон 313M32 конкурирует с CD155 за связывание с TIGIT с гораздо более низкой эффективностью (0,65 нМ).

Таблица 19

Данные IC_{50} и сравнение различных α -TIGIT клонов для конкуренции CD155 на TIGIT человека

Клон	IC_{50} конкуренции CD155 за связывание TIGIT (в нМ)	Кратное изменение IC_{50} на IC_{50} лучшего клона (31282_up)
31282_wu	0,05	1,3
31282_up	0,04	1
313M32	0,65	16,7
4.1D3	0,07	1,9
22G2	0,09	2,2
31C6	0,07	1,7
TIG1	0,06	1,6

Пример 20. Функциональная характеристика антагонистических анти-TIGIT клонов.

А. Функциональный анализ TIGIT с клетками Jurkat-hTIGIT.

Чтобы охарактеризовать функциональные последствия блокирования человеческого TIGIT-рецептора, мы совместно культивировали клетки Jurkat, которые экспрессируют hTIGIT, и репортер люциферазы, активированный после захвата TCR (Эффекторные клетки TIGIT формата "разморозь и используй" (Thaw-and-Use) от Promega), с клеточной линией CHO-K1, разработанной для экспрессии PVR/CD155 и TCR активатора человека ("разморозь и используй" CD155 aAPC/CHO-K1 от Promega). Активация TIGIT-сверхэкспрессирующих клеток Jurkat может быть индуцирована контактом с CD155-экспрессирующими клетками CHO-K1 при вовлечении TCR в клетки Jurkat и может быть увеличена в присутствии анти-TIGIT антитела-антагониста. Чтобы сравнить эффективность различных α -TIGIT клонов в увеличении активации клеток Jurkat, эксперимент проводился в присутствии возрастающих концентраций антител и рассчитывались значения EC_{50} .

Клетки CD155 aAPC/CHO-K1 (Promega, CS198811) высевали в соответствии с рекомендациями производителя и инкубировали при 37°C в 5% CO_2 -инкубаторе O/N. На следующий день эффекторные клетки TIGIT (Promega, CS198811) были добавлены в соответствии с рекомендациями производителя в планшеты для клеток CD155 aAPC/CHO-K1, содержащие свежую полную среду с анти-TIGIT антителом

в увеличивающихся концентрациях (0,03; 0,11; 0,33; 1,06; 3,34; 10,56; 33,38; 105,49 и 333 нМ) и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 6 ч. После 6 ч инкубации активацию эффекторных клеток TIGIT оценивали путем измерения активности люциферазы с использованием системы анализа люциферазы Bio-GloTM (Promega, G7941).

Как продемонстрировано на фиг. 24А и суммировано в табл. 20, анти-TIGIT антитело 31282 обладает наилучшей эффективностью в отношении значения EC₅₀ и максимальной индукции сигнала люциферазы в анализе. Активность, наблюдаемая для клона, продуцируемого в клетках НЕК (31282_up) или СНО-К1 (31282_wu), сопоставима с максимальным сигналом люциферазы, который в 8 раз выше, чем у изотипического контроля (Bioexcell, BE0297), и с концентрацией EC₅₀, измеренной при 3,3 нМ и 3,5 нМ, соответственно. Для сравнения, клоны 4.1D3, 22G2 и 31С6 имеют максимальную активность между 5,3 и 6,7 раза по сравнению с изотипическим контролем, связанную с EC₅₀ между 5 и 10 нМ. Значения EC₅₀ для клона 313М32 и TIG1 не могут быть определены из-за низкой активности и плохого соответствия кривых при испытанных концентрациях (фиг. 24А).

Таблица 20

Данные EC₅₀ и сравнение различных клонов α-TIGIT по функциональной активности на клетках Jurkat-hTIGIT

Имя клона	Индукция по изотипическому контролю (кратное изменение)	EC ₅₀ (нМ)	Кратное изменение EC ₅₀ на EC ₅₀ лучшего клона (31282_up)
31282_wu	8,4	3,5	1,1
31282_up	8,0	3,3	1
313М32	/	P.F.	/
4.1D3	5,8	10,3	3,1
22G2	5,3	5,2	1,6
31С6	6,7	5,3	1,6
TIG1	/	P.F.	/

P.F.: плохо подходит.

В. Функциональный анализ TIGIT на первичных CD8⁺ Т-клетках человека от здоровых добровольцев

Чтобы охарактеризовать функциональные последствия блокировки TIGIT-рецептора человека, мы совместно культивировали первичные CD8⁺ Т-клетки человека из МКПК здоровых человеческих доноров с клеточной линией СНО-К1, сконструированной для экспрессии PVR/CD155 человека и активации Т-клеток человека. Мы наблюдали, что высвобождение ИФНγ CD8⁺ Т-клетками в присутствии сконструированных CD155-экспрессирующих СНО-К1 клеток может быть увеличено путем блокирования hTIGIT антагонистическими анти-TIGIT антителами. Чтобы сравнить эффективность этих антител в увеличении высвобождения ИФНγ, эксперимент проводили в присутствии возрастающих концентраций антител и рассчитывали значения EC₅₀.

Клетки CD155 аАРС/СНО-К1 (Promega, CS198811) высевали в 96-луночные планшеты с U-образным дном в соответствии с рекомендациями производителя и инкубировали при 37°C в 5% CO₂-инкубаторе O/N. На следующий день CD8⁺ Т-клетки очищали в соответствии с рекомендациями производителя с использованием набора для отрицательной селекции (Stemcell Technologies, 17953) из замороженных мононуклеарных клеток периферической крови человека, выделенных из крови здоровых доноров (Immunehealth). Очищенные CD8 Т-клетки и увеличивающиеся концентрации (0,011 нМ, 0,033 нМ, 0,11 нМ, 0,33 нМ, 1,06 нМ, 3,3 нМ, 10,6 нМ, 33,3 нМ и 105,5 нМ) антител затем добавляли к CD155 аАРС/СНО-К1 (100000 CD8 Т-клеток/100 мкл полной среды, содержащей антитела) и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 5 дней. Наконец, концентрации ИФНγ оценивали в клеточном супернатанте с использованием анализа ИФА (Affymetrix eBioscience, 88-7316-86), который проводили в соответствии с рекомендациями производителя.

Как продемонстрировано на фиг. 24В и суммировано в табл. 21, клон α-TIGIT 31282 и 4.1D3 демонстрирует лучшую индукцию секреции ИФНγ с соответствующим увеличением в 2,7 и 2,9 раза по сравнению с антителом изотипического контроля. Клон 31282 обладает наилучшей эффективностью для индукции продукции ИФНγ с точки зрения концентрации EC₅₀, которая была измерена при 0,13 нМ. Клон 31С6 демонстрирует значение EC₅₀, в 2,3 раза отличающееся, в то время как клон 22G2 и 4.1D3 в 3,1 и 10,8 раза менее эффективны, чем клон 31282. Значение не может быть определено для клона 313М32 из-за низкой активности и плохого соответствия кривых при испытанных концентрациях (фиг. 24В).

Таблица 21

Данные EC₅₀ и сравнение различных клонов α-TIGIT по функциональной активности на первичных CD8⁺ Т-клетках человека

Клон	Индукция по изотипическому контролю (кратное изменение)	EC ₅₀ (нМ)	Кратное изменение EC ₅₀ на EC ₅₀ лучшего клона (31282_wu)
31282_wu	2,7	0,13	1
313M32	/	P.F.	/
4.1D3	2,9	1,43	10,8
22G2	1,5	0,41	3,1
31C6	1,6	0,30	2,3

С. Функциональный анализ TIGIT на первичных CD3⁺ Т-клетках человека от больных раком.

Чтобы охарактеризовать функциональные последствия блокировки TIGIT-рецептора человека на Т-клетках от больных раком, первичные CD3⁺ Т-клетки человека из МКПК пациента больного раком совместно культивировали с клеточной линией CHO-K1, сконструированной для экспрессии PVR/CD155 человека и активации Т-клеток человека (CHO-TCR-CD155). Мы наблюдали, что высвобождение ИФНγ CD3⁺ Т-клетками в присутствии сконструированных CD155-экспрессирующих CHO-K1 клеток может быть увеличено путем блокирования hTIGIT анти-TIGIT антителом-антагонистом 31282.

Клетки CD155 aAPC/CHO-K1 (Promega, CS198811) высевали в 96-луночные планшеты с U-образным дном в соответствии с рекомендациями производителя и инкубировали при 37°C в 5% CO₂-инкубаторе O/N. На следующий день CD3⁺ Т-клетки очищали в соответствии с рекомендациями производителя с использованием набора для отрицательной селекции (Stemcell Technologies, 17951) из свежих мононуклеарных клеток периферической крови человека, выделенных из общей крови от ракового пациента (HNSCC), собранных за 24 ч (Biopartners). Очищенные CD3⁺ Т-клетки и 66,7 нМ антител затем добавляли к CD155 aAPC/CHO-K1 (100000 CD3 Т-клеток/100 мкл полной среды, содержащей антитела) и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 5 дней. Наконец, концентрации ИФНγ оценивали в клеточном супернатанте с использованием анализа ИФА (Affymetrix eBioscience, 88-7316-86), который проводили в соответствии с рекомендациями производителя.

Как продемонстрировано на фиг. 24С, антитело 31282 индуцировало сильную функциональную активность для увеличения секреции ИФНγ, демонстрируя способность этого α-TIGIT антитела реактивировать Т-клетки МКПК от пациентов больных раком.

Д. Клон α-TIGIT 31282 увеличивает внутриклеточную выработку цитокинов в Т-клетках от МКПК больных раком и диссоциированных опухолевых клеток (DTC).

В этом примере было проведено окрашивание внутриклеточной проточной цитометрией для оценки продукции Т-клеточных цитокинов из свежеизолированных согласованных МКПК и опухолевых инфильтрированных лимфоцитов в диссоциированных опухолевых клетках (DTC) от пациентов с раком почечной карциномы. Для DTC опухоли измельчали механическим путем, а затем инкубировали с набором для диссоциации опухоли (Miltenyi Biotec # 130-095-929) при вращении в диссоциаторе gentle-MACS, следуя инструкциям производителя для определенных типов опухолей. Клетки стимулировали в течение 16 ч коктейлем шариков для стимуляции Т-клеток (Dynabeads, Thermo Fisher) перед выполнением внутриклеточного окрашивания. В течение последних 3 ч стимуляции к клеткам добавляли коктейль с ингибитором транспорта белка (eBioscience) и коктейль клеточной стимуляции (eBioscience). Конъюгированные антитела были приобретены у eBioscience/Thermo Fisher Scientific, BioLegend или BD Biosciences. Окрашивание поверхности проводили согласно инструкции производителя, используя отфильтрованный буфер FACS (ФСБ + 2 мМ ЭДТА + 0,1% БСА) и буфер Brilliant Stain (BD # 563794). Клетки блокировали соответствующим человеческим FcBlock (BD # 564220) до окрашивания поверхности. Для внутриклеточного окрашивания клетки фиксировали и пермеабелизировали, используя раствор BD Cytofix/цитоперм (BD Biosciences). Клетки окрашивали следующей панелью антител: анти-CD45-BB515 (клон HI30, BD Horizon 564585), анти-CD73-BV421 (клон AD2, BD Horizon 562430), анти-CD8a-BV510 (клон SK1, BD Horizon 563919), анти-CD3-BV650 (клон SK7, BD Horizon 563999), анти-ИФНγ-BV711 (клон 4S.B3, BD Horizon 564793), анти-ИЛ-2-APC (MQ1-17H12, eBioscience 17-7029-82), анти-CD4-APC-R700 (клон RPA-T4, BD Horizon 564975), LVD efluor 780 (eBioscience 65-0865-14), анти-TIGIT-PE (клон MBSA43, eBioscience E13456-108), анти-CD39-PE-Dazzle594 (клон A1, Biolegend 328224) и ФНОα-PE-cy7 (клон Mab11, eBioscience 25-7349-82). Получение было выполнено на FACS Fortessa (BD Biosciences) и проанализировано с помощью программного обеспечения FlowJo (FlowJo, LLC). Жизнеспособные клетки были стробированы на прямом и боковом рассеянии. Подмножества Т-клеток были стробированы следующим образом: CD45⁺ CD3⁺ для МКПК и CD45⁺ CD3⁺CD4⁺ и CD45⁺ CD3⁺ CD8⁺ для DTC. Цитокин-секретирующие Т-клетки подвергали стробированию с использованием неокрашенных и нестимули-

рованных контролей.

На фиг. 24D продемонстрировано, что внутриклеточное содержание ИЛ2, ИФН γ и ФНО α все увеличивалось при активации в присутствии α -TIGIT клона 31282. Это увеличение наблюдалось в CD3 $^+$ Т-клетках из МКПК в соответствии с данными, проиллюстрированными на фиг. 24С, а также в CD4 $^+$ и CD8 $^+$ TIL из диссоциированных опухолевых клеток. Это демонстрирует способность α -TIGIT клона 31282 увеличивать активацию популяций МКПК и TIL из Т-клеток больных раком.

Пример 21. α -TIGIT клон 31282 индуцирует преимущественную цитотоксичность Treg в МКПК от больных раком.

В этом примере выделенные МКПК от пациента с раком легкого ресуспендировали в полной среде RPMI (дополненной 10% FBS, инактивированной теплом + 50 ЕД пенициллина + 50 ЕД стрептомицина). $2,5 \times 10^5$ МКПК человека были распределены на лунку в 96-луночном планшете. Клон 31282 анти-TIGIT антитела человека, изотипический контроль IgG1 человека (BioXcell BE0297) или ритуксимаб (InvivoGen hcd20-mab1) добавляли в конечной концентрации 6,6 нМ в каждую соответствующую лунку. Клетки инкубировали в течение 20 ч при 37°C с 5% CO $_2$. Затем клетки собирали и окрашивали следующей панелью антител: LVD efluor 520 (eBioscience 65-0867-14), анти-TCR α -PercP-Cy5.5 (клон IP26, Biolegend 306723), анти-CD4-BV510 (клон SK3, BD Horizon 562970), анти-CD8-APC-Cy7 (клон SK1, Biolegend 344714), анти-CD25-BV605 (клон 2A3, Biolegend 562660), анти-CD127-APC (A019D5, Biolegend 351316), анти-CCR7-BV421 (клон G043H7, Biolegend 353207) и анти-CD45RO-PE-Cy7 (клон UCHL1, Biolegend 304229). Результаты представлены на стробированных живых клетках. Абсолютное количественное определение выполняется с использованием гранул AccuCheck Counting (Life technologies) в соответствии с инструкциями производителя. После расчета абсолютного количества клеток на мкл, % специфического лизиса рассчитывают по следующей формуле = $(1 - (\text{абсолютное количество клеток на мкл на образце, обработанном антителом TIGIT 31282} / \text{среднем значении образцов обработанных в трех повторностях изотипическим контролем})) \times 100$. Результаты представлены в виде среднего % специфического лизиса в трех экземплярах \pm SD. Цитотоксическую активность эффекторных клеток АЗКЦ/ADCP оценивали путем измерения % специфического лизиса клеток на стробированных клетках CD19 $^+$ при инкубации с ритуксимабом.

Как продемонстрировано на фиг. 25, анти-TIGIT клон 31282 запускает более высокий специфический лизис на Treg клетках (30,1 \pm 3%), чем на CD45RO $^+$ CCR7 $^{+/-}$ CD8 $^+$ Т-клетках (общие CD8 $^+$ Т-клетки памяти) (-1,48 \pm 6%) или CD45RO $^+$ CCR7 $^{+/-}$ CD4 $^+$ Т (общие CD4 $^+$ Т-клетки памяти) (0,64 \pm 3%). Положительный контроль ритуксимаба запускает 77,9% (\pm 6,8%) специфического лизиса на стробированных CD19 $^+$ клетках. Общие данные демонстрируют преимущественное истощение Treg клеток от МКПК больных раком по сравнению с популяциями общих CD4 $^+$ и CD8 $^+$ Т-клеток памяти. Подобное преимущественное истощение Treg клеток наблюдалось при использовании клеток от пациента с аденокарциномой толстого кишечника.

Пример 22. Характеристика экспрессии TIGIT на иммунных популяциях МКПК больных раком и диссоциированных опухолевых клетках.

Анализ проточной цитометрии были выполнены для оценки экспрессии TIGIT на подмножествах иммунных клеток из свежеизолированных согласованных МКПК и опухолевых инфильтрированных лимфоцитов в диссоциированных опухолевых клетках (DTC) от больных раком. Были получены образцы от разных показаний: Рак яичников, рак почек, HNSCC, рак кожи, меланома и рак легких. Для DTC опухоли измельчали механическим путем, а затем инкубировали с набором для диссоциации опухоли (Miltenyi Biotec # 130-095-929) при вращении в диссоциаторе gentleMACS, следуя инструкциям производителя для определенных типов опухолей. МКПК выделяли из цельной крови на среде с градиентом плотности (Lymphoprep Axis-Shield # 1115758). Данные по фенотипированию сравнивали с замороженными МКПК, выделенными у здоровых людей (n=10).

Клетки окрашивали в соответствии с инструкцией производителя, используя отфильтрованный буфер FACS (ФСБ + 2 мМ ЭДТА + 0,1% БСА) и буфер Brilliant Stain (BD # 563794). Клетки блокировали с помощью соответствующего человеческого FcBlock (BD # 564220) перед окрашиванием и фиксировали, используя буфер для фиксации IC (eBioscience # 00-8222-49), до получения. DTC окрашивали следующей панелью антител: анти-CD45-BB515 (клон HI30, BD Horizon 564585), анти-CD73-BV421 (клон AD2, BD Horizon 562430), анти-CD8a-BV510 (клон SK1, BD Horizon 563919), анти-CD3-BV650 (клон SK7, BD Horizon 563999), анти-CD56-BV711 (клон 5.1H11, Biolegend 362542), анти-CD279-BV785 (клон EH12.2H7, Biolegend 329930), анти-CD127-APC (клон A019D5, Biolegend 351316), анти-CD4-APC-R700 (клон RPA-T4, BD Horizon 564975), LVD efluor780 (eBioscience 65-0865-14), анти-TIGIT-PE (клон MBSA43, eBioscience E13456-108), анти-CD39-PE-Dazzle594 (клон A1, Biolegend 328224) и CD25-PE-cy7 (клон BC96, Biolegend 302612). МКПК окрашивали следующей панелью антител: анти-CD45RO-BB515 (клон UCHL1, BD Horizon 564529), анти-CD73-BV421 (клон AD2, BD Horizon 562430), анти-CD8a-BV510 (клон SK1, BD Horizon 563919), анти-CD3-BV650 (клон SK7, BD Horizon 563999), анти-CD56-BV711 (клон 5.1H11, Biolegend 362542), анти-CD197-BV786 (клон 3D12, BD Horizon 563710), анти-CD127-APC (клон A019D5, Biolegend 351316), анти-CD4-APC-R700 (клон RPA-T4, BD Horizon 564975), LVD efluor 780 (eBioscience

65-0865-14), анти-TIGIT-PE (клон MBSA43, eBioscience E13456-108), анти-CD39-PE-Dazzle594 (клон A1, Biolegend 328224) и CD25-PE-cy7 (C1 кости BC96, Biolegend 302612). Получение было выполнено на FACS Fortessa (BD Biosciences) и проанализировано с помощью программного обеспечения FlowJo (FlowJo, LLC). Жизнеспособные клетки были стробированы на прямом и боковом рассеянии. Различные подмножества иммунных клеток были стробированы следующим образом: CD3⁺ CD4⁺ CD127⁺ CD25⁻ (CD3⁺ CD4⁺ не-Treg клетки), CD3⁺ CD4⁺ CD127^{низкий} CD25⁺ (регуляторные Т-клетки), CD3⁺ CD8⁺ (CD3⁺ CD8⁺ Т-клетки), CD3⁻ CD56⁺ (НК-клетки), CD3⁺ CD56⁺ (НКТ клетки), CD3⁻ CD56⁻ (не-Т/НК-клетки). Шаррики Quantibrite PE (BD #340495) использовали при одинаковых настройках прибора и использовали для преобразования данных флуоресценции в количество связанных антител на клетку.

Частота экспрессии TIGIT в различных иммунных популяциях представлена на фиг. 26А, а плотность TIGIT для каждого подмножества представлена на фиг. 26В с использованием представления Бокса и Уиксера с использованием метода Тьюки для вычисления процентилей.

Данные показывают, что частота TIGIT на подмножестве Т-клеток выше у МКПК от пациентов больных раком по сравнению с МКПК от здоровых доноров. Эта частота дополнительно увеличивается на DTC TILS (фиг. 26А). В то время как то же самое наблюдение было сделано при изучении плотности TIGIT на поверхности CD3⁺ CD4⁺ не-Treg клеток и CD4⁺ Treg клеток, для CD3⁺ CD8⁺ Т-клеток количество молекул TIGIT на клетку уменьшается на DTC TILS (фиг. 26В).

Пример 23. Структурное и функциональное картирование эпитопа TIGIT и клона 31282.

Чтобы дополнительно охарактеризовать и понять взаимодействие между анти-TIGIT мАт клоном 31282 и рекомбинантным белком TIGIT, кристаллическую структуру 31282 в комплексе с TIGIT определяли с помощью дифракции рентгеновских лучей.

А. Экспрессия, очистка и кристаллизация TIGIT и Fab.

Остатки TIGIT человека 23-128 были произведены Proteros Biostructures GmbH. TIGIT (23-128) с N-концевой HIS-меткой (расщепляемый тромбином) клонировали в pET15b и экспрессировали в среде LB в B121 (DE3) при 37°C в теле включения. Тельца включения (IB) промывали буфером, содержащим Трис/HCl pH 7,4 и Трис/HCl pH 7,4, 0,05% Brij-35. IB были денатурированы с помощью 6 M Gdm/HCl, 50 mM Трис, pH 8,5 и 10 mM DTT. Рефолдинг выполняли в 50 mM Трис/HCl, pH 8, 1 mM GSH, 0,5 mM GSSG, 150 mM NaCl. Рефолдированный белок очищали на HIS-ловушке. N-концевую HIS-метку удаляли расщеплением тромбина и дальнейшей очисткой на Superdex-75, уравновешенном в 50 mM Трис/HCl pH 7,5, 200 mM NaCl.

Для экспрессии фрагмента Fab, клетки HEK293F выращивали во Freestyle F17 с 1% пенициллина/стрептомицина, 2 mM L-глутамина и 0,1% плуороника. Расширенные культуры для трансфекции культивировали в 3 л колбах Эрленмейера (Corning, 2 л, рабочий объем клеточных культур, 37°C, 8% об./об. CO₂, 80-120 об/мин, амплитуда 50 мм). Культуру разбавляли за один день до трансфекции, и количество клеток доводили до 1×10⁶ клеток/мл. Объем культуры экспрессии составил 6 л. Транзиентную трансфекцию проводили плазидами для легкой и тяжелой цепи Fab. MasterMix ДНК/FectoPro (FectoPro, PolyPlus) готовили в чистой среде F17 и инкубировали в течение 10 минут (согласно протоколу PolyPlus). Эту смесь для трансфекции добавляли к суспензии клеток по каплям, и бустер добавляли немедленно. Через 18 часов после трансфекции культуру питали 3 г/л глюкозы.

Для очистки фрагмента Fab, 6 л супернатанта клеточной культуры HEK293 собирали центрифугированием через 6 дней после трансфекции и наносили на 30 мл колонку KappaSelect. KappaSelect промывали ФСБ pH 7,4, элюировали цитратом натрия pH 3 и фракции, содержащие Fab, нейтрализовали трис-буфером. Затем Fab очищали на колонке Superdex S-200, уравновешенной в 20 mM Трис, pH 8, 100 mM NaCl, и хранили при -80°C до дальнейшего использования.

Для образования комплекса Fab-TIGIT, очищенный TIGIT смешивали с очищенным Fab в соотношении 1,5:1, и комплекс очищали на Superdex-200, уравновешенном в 20 mM Трис, pH 8, 100 mM NaCl. Комплекс Fab-TIGIT концентрировали до 35 мг/мл для кристаллизации. Комплекс Fab-TIGIT кристаллизовали при 277 К с использованием метода диффузии паров путем смешивания 0,1 мкл белкового раствора (35,3 мг/мл в 20 mM Трис pH 8,0; 100 mM NaCl) в соотношении 1:1 с раствором в резервуаре (0,10 M натрия какодилат, pH 6,00; 15% (масса/объем) PEG4000). Кристаллы были крио-защищены, погружая их в резервуарный раствор с добавлением 25% глицерина.

В. Сбор и обработка данных.

Крио-протокол был установлен с использованием стандартных протоколов Proteros Biostructures GmbH. Кристаллы подвергались мгновенному замораживанию и измерялись при температуре 100 К. Данные рентгеновской дифракции были получены на кристаллах комплекса Fab:TIGIT на SWISS LIGHT SOURCE (SLS, Виллиген, Швейцария) в криогенных условиях. Кристаллы принадлежат к пространственной группе P1. Данные были обработаны с использованием программ XDS и XSCALE. Статистику сбора и обработки данных можно найти в табл. 22.

Статистика сбора и обработки данных

Рентгеновский источник	PXII/X10SA (SLS ¹)
Длина волны [Å]	1,0000
Детектор	PILATUS 6M
Температура [K]	100
Пространственная группа	P1
Клетка: a; b; c; [Å]	41,73; 71,46; 110,26
α ; β ; γ ; [°]	96,7; 95,8; 106,5
Разрешение [Å]	2,31 (2,56-2,31)
Уникальные отражения	50537 (13271)
Множественность	2,0 (1,9)
Полнота [%]	96,1 (95,3)
R _{сип} [%]	8,1 (43,5)
R _{средние} [%]	11,0 (59,1)
Среднее(I)/sd ³	8,11 (1,94)

¹ SWISS LIGHT SOURCE (SLS, Виллиген, Швейцария).

² значения в скобках относятся к ячейке с самым высоким разрешением оснований.

³ рассчитывается по независимым отражениям.

С. Структурное моделирование и уточнение.

Информация о фазе, необходимая для определения и анализа структуры, была получена путем молекулярного замещения. Ранее решенная структура Fab использовалась в качестве поисковой модели. Последующее построение и уточнение модели проводилось в соответствии со стандартными протоколами с пакетами программ CCP4 и COOT. Для расчета свободного R-фактора, меры для перекрестной проверки правильности окончательной модели, около 2,5% измеренных отражений были исключены из процедуры уточнения (см. табл. 23).

Было проведено уточнение TLS (с использованием REFMAC5, CCP4), что привело к снижению R-факторов и повышению качества плотности электронной карты. Были применены автоматически созданные локальные ограничения NCS (ключевое слово "ncsg локальный" в более новых версиях REFMAC5). Параметризацию лигандов и генерирование соответствующих библиотечных файлов осуществляли с помощью CHEMSKETCH и LIBCHECK (CCP4), соответственно.

Модель воды была построена с помощью алгоритма "Поиск воды" COOT, поместив молекулы воды в пики Fo-Fc карты с контуром 3.0, с последующим уточнением с помощью REFMAC5 и проверкой всех вод с помощью инструмента валидации COOT. Критерии для списка подозреваемых вод были: B-фактор больше 80 Å², 2Fo-Fc карта менее чем 1,2 σ , расстояние до ближайшего контакта менее чем 2,3 Å или более чем 3,5 Å. Подозреваемые молекулы воды и молекулы в сайте связывания лиганда (расстояние до лиганда менее чем 10 Å) проверяли вручную. Окончательная сложная структура была усовершенствована с помощью PHENIX. Мы выбрали параметр уточнения, включая координаты XYZ, реальное пространство, отдельные B-факторы и B-факторы группы. Оптимизация рентгеновского/стереохимического веса и NCS ограничения были также выбраны для уточнения. График Рамачандрана в окончательной модели показывает 95,39% всех остатков в предпочтительном участке, 3,95% в разрешенном участке. Статистика окончательной структуры и процесса уточнения приведены в табл. 23.

Статистика уточнений¹

Разрешение [Å]	108,40-2,31
Количество отражений (рабочие/тестовые)	49289/1247
R _{рабочее}	0,2025
R _{свободное} [%]	0,2466
Общее количество атомов:	
Белок	8282
Вода	676
Отклонение от идеальной геометрии: ³	
Длина связи [Å]	0,003
Углы связи [deg]	0,771
График Рамачандра: ²	
Предпочтительные участки [%]	95,39
Разрешенные участки [%]	3,95
Запрещенные участки [%]	0,66

¹ значения, как определено в PHENIX.

² расчет с COOT.

D. Общая структура.

Тяжелые и легкие цепи фрагмента Fab антитела человека демонстрируют типичное свертывание антител человека (фиг. 27A). В асимметричной единице присутствуют два гетеротримера с одинаковой общей конформацией. Модель содержит остатки с 23 по 128 TIGIT, остатки с 1 по 224 тяжелой цепи клона 31282 и остатки с 1 по 214 легкой цепи клона 31282. Один участок короткой петли тяжелой цепи не полностью определяется электронной плотностью и поэтому не включен в модель.

Дифракционные изображения были проанализированы с использованием программы FoldX для оценки энергетического вклада остатков и определения горячих точек взаимодействия. Аминокислотные остатки, образующие интерфейс связывания, хорошо определены на карте электронной плотности. Интерпретированные данные дифракции рентгеновских лучей ясно показывают взаимодействие между Fab и TIGIT (фиг. 27B и 27C). CDR легкой цепи клона 31282 взаимодействуют с 2 участками TIGIT с CDR L1 Arg30 и Tyr33, связываясь с остатками TIGIT Asn58 и Glu60; с CDR L1 Arg30 и CDR L3 Phe93, связывающимися с остатком TIGIT Ile109. CDR L2 не имеет контакта с TIGIT (табл. 24). Клон 31282 тяжелой цепи взаимодействует с различными участками TIGIT с CDR H1 Tyr33, связываясь с TIGIT по остатку Leu73; с CDR H2 Val50, Ser54 и Ser57, связывающимися с TIGIT по остатку Leu73; с CDR H3 Asp102, Tyr103 и Trp104, связывающимися с TIGIT по остатку Gln56, Ile68, Leu73 и His76.

Основываясь на этой кристаллической структуре комплекса клон 31282/TIGIT а-TIGIT, остатки TIGIT, которые контактируют с клоном 31282 (остатки эпитопа для TIGIT, связанные с клоном 31282), и остатки клона 31282, которые контактируют с TIGIT (остатки паратопа для клона 31282, связанного TIGIT) были определены. В табл. 24 и 25 и на фиг. 27C продемонстрированы остатки TIGIT в контакте с остатками легкой (табл. 24) или тяжелой (табл. 25) цепи клона 31282. Остатки контакта определяли как каждую аминокислоту, соответствующую каждому из следующих критериев: (i) она имеет рассчитанный вклад свободной энергии связывания, более чем 0,3 ккал/моль, (ii) она имеет экспериментальный усредненный B-фактор менее чем среднее значение B-фактора всех остатков в структуре рентгеновских лучей, (iii) она создает по крайней мере 3 пары межатомных контактов тяжелых атомов с атомами антител на расстоянии менее чем или равном 4,0 Ангстрем, (iv) она не образует только открытую растворителю водородную связь или ионные взаимодействия, (v) если она представляет собой неароматический полярный остаток (Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys или Arg), создает по меньшей мере одну водородную связь или ионное взаимодействие с антителом.

Таблица 24

Краткое изложение остатков эпитопа TIGIT и соответствующих остатков паратопа на легкой цепи клона 31282

Аминокислота TIGIT	Аминокислота легкой цепи клона 31282
Asn 58	Tyr 33
Glu 60	Arg 30 Tyr 33
Ile 109	Arg 30 Phe 93

Таблица 25

Краткое изложение остатков эпитопа TIGIT и соответствующих остатков паратопа на тяжелой цепи клона 31282

Аминокислота TIGIT	Аминокислота тяжелой цепи клона 31282
Gln 56	Trp 104
Ile 68	Tyr 103 Trp 104
Leu 73	Tyr 33 Val 50 Ser 54 Val 50
His 76	Asp 102 Tyr 103 Trp 104

Пример 24. Анализ конкуренции между α -TIGIT клонами 31282 и 32959.

Клон 32959 анти-TIGIT антитела изотипа IgG1 человека продуцировали в клетках НЕК и очищали, как описано в примере 17 выше.

Клетки Jurkat со сверхэкспрессией TIGIT человека (Jurkat-hTIGIT) собирали и распределяли по 5×10^4 клеток/лунка и инкубировали с антагонистом α -TIGIT клона 31282 в следующих концентрациях: 0 нМ (без Ат), 0,08 нМ, 0,16 нМ, 0,8 нМ и 8 нМ, которые представляют диапазон концентраций от 0 до 100, превышающий Kd этого клона. Избыток антител отмывали, и клетки инкубировали с уменьшающейся концентрацией (8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,062; 0,031; 0,016; 0,008 и 0,004 нМ) непосредственно связанного (AF647) анти-TIGIT клона 32959 в течение 30 мин при 4°C. Среднее геометрическое значение интенсивности флуоресценции анализировали с использованием LSR BD Fortessa. Связывание клеток регистрировали как среднюю интенсивность флуоресценции AF647. Для расчета EC₅₀ связывания клона 32959, половинную максимальную концентрацию связывания (EC₅₀) с hTIGIT-Jurkat рассчитывали с использованием уравнения соответствия кривой с четырьмя переменными в Prism, и полученные значения продемонстрированы в табл. 26 и проиллюстрированы на фиг. 28. Результаты показывают сильное связывание α -TIGIT клона 32959 независимо от концентрации клона 31282, демонстрируя отсутствие конкуренции с α -TIGIT антителом-антагонистом.

Таблица 26

EC₅₀ концентрации для связывания α-TIGIT клона 32959 с Jurkat-hTIGIT в присутствии увеличивающейся концентрации антагониста α-TIGIT клона 31282

	α-TIGIT 31282 при 0 нМ	α-TIGIT 31282 при 0,08 нМ	α-TIGIT 31282 при 0,16 нМ	α-TIGIT 31282 при 0,8 нМ	α-TIGIT 31282 при 8 нМ
EC ₅₀ связывания (нМ) для α-TIGIT клона 32959	0,22	0,33	0,37	0,49	0,39
Связывание клеток Jurkat человеческим TIGIT FON (Кратность по сравнению с отрицательным контролем) для α-TIGIT клона 32959	588				

Пример 25. Определение фармакокинетического профиля клона 31282 после однократной в/в инъекции обезьяне яванцу.

Обезьяны яванцы получали α-TIGIT клон 31282 IgG1 или IgG4 путем в/в болюсной инъекции. Антитело вводили в 3 различных концентрациях (0,1 мг/кг; 1 мг/кг; 10 мг/кг) 2 животным (1 самец и 1 самка). Кровь собирали через 504 часа после введения дозы в день 1. Образцы крови обрабатывали для получения плазмы и анализировали на концентрацию α-TIGIT клона 31282 IgG1 или IgG4 с использованием метода ИФА.

Данные по концентрации в плазме по времени для отдельных животных были использованы для расчета значений токсикокинетических параметров для α-TIGIT IgG1 и IgG4 31282 клонов после в/в с использованием внутрисосудистой модели в Phoenix WinNonlin (версия 6.3, Pharsight, компания Celera, Принстон, Нью-Джерси).

После в/в болюсного введения α-TIGIT 31282 клона IgG1 и IgG4 в дозах 0,1, 1 и 10 мг/кг концентрации IgG1 количественно определяли в плазме самцов и самок обезьян через 240 ч, 336 ч и 504 ч после введения дозы, соответственно, и IgG4 количественно определяли через 168 ч, 240 ч и 504 ч, соответственно (фиг. 29 и табл. 27). Не было никаких видимых половых различий в системном воздействии (C_{max} и AUC_{last}) на IgG1 и IgG4 после в/в болюсного введения α-TIGIT клона 31282 IgG1 или IgG4, с соотношениями (самцы/самки) в диапазоне от 0,855 до 1,16.

После в/в болюсного введения α-TIGIT клона 31282 IgG1 самцам и самкам обезьян, концентрации в плазме IgG1 снижались двухфазно при всех уровнях дозы со средним конечным периодом полужизни (t_{1/2}) в диапазоне от 84,7 до 174 ч (фиг. 29). Системный клиренс (CL) был одинаковым для всех исследованных доз, в диапазоне от 0,280 до 0,392 мл/ч/кг. Кажущийся объем распределения в устойчивом состоянии (V_{SS}) был одинаковым среди протестированных уровней дозы, со значениями в диапазоне от 53,7 до 66,5 мл/кг. Увеличение дозы α-TIGIT клона 31282 IgG1 в 10 раз в диапазоне от 0,1 до 1 мг/кг и от 1 до 10 мг/кг приводило к приблизительно пропорциональному увеличению воздействия (увеличение от 9,57 до 14,5 раза).

После в/в введения α-TIGIT клона 31282 IgG4 самцам и самкам обезьян, концентрации IgG4 в плазме двухфазно снижались при всех протестированных уровнях дозы с t_{1/2} 148-334 ч (фиг. 29 и табл. 28). CL был постоянным среди тестируемых уровней доз в диапазоне от 0,160 до 0,219 мл/ч/кг. Среднее значение V_{SS} варьировалось от 41,2 до 70,7 мл/кг. Увеличение дозы α-TIGIT клона 31282 IgG4 в 10 раз в диапазоне от 0,1 до 1 мг/кг и от 1 до 10 мг/кг приводило к приблизительно пропорциональному увеличению воздействия IgG4 (увеличение от 9,32 до 12,5 раз).

Таблица 27

Краткое содержание средних параметров токсикокинегики для а-TIGIT клопа 31282 IgG1 человека после в/в болюсного введения у обезьяны яванца

а-TIGIT клон 31282 IgG1 человека			
Доза (мг/кг)	0,1	1	10
C _{max} (мкг/мл)	2,34	22,4	268
t _{max} (ч)	1	1	1
AUC _{последний} (ч*мкг/мл)	224	2330	33700
t _{1/2} (ч)	174	84,7	111
Cl (мл/ч/кг)	0,292	0,392	0,280
V _{ss} (мл/кг)	66,5	57,2	53,7

Таблица 28

Краткое содержание средних параметров токсикокинетики для а-TIGIT клопа 31282 IgG4 человека после в/в болюсного введения у обезьяны яванца

а-TIGIT клон 31282 IgG4 человека			
Доза (мг/кг)	0,1	1	10
C _{max} (мкг/мл)	2,81	26,2	283
t _{max} (ч)	1	1	1
AUC _{последний} (ч*мкг/мл)	238	2690	39100
t _{1/2} (ч)	251	334	182
Cl (мл/ч/кг)	0,190	0,160	0,216
V _{ss} (мл/кг)	65,7	70,7	57,5

Пример 26. Характеристика экспрессии TIGIT в популяциях опухолевых клеток человека.

Анализы проточной цитометрии были выполнены для оценки экспрессии TIGIT на нормальных и опухолевых Т- или В-клетках в образцах крови от больных раком с различными признаками рака крови.

Образцы пациентов с синдромом Сезари были протестированы для сравнения экспрессии TIGIT на популяциях злокачественных и нормальных CD4⁺ Т-клеток. Чтобы разделить эти популяции, было проведено предварительное определение перегруппировки злокачественного клона TCR-Vb с использованием набора Beckman Coulter TCR-Vb (# IM3497). После того, как злокачественный клон был идентифицирован, экспрессия TIGIT была профилирована на иммунных клетках пациентов с синдромом Сезари с использованием следующих коммерческих реагентов: анти-CD3 Krome Orange (#B00068), анти-CD4-PE (#A07751), анти-CD8-PC7 (#737661), анти-CD56-PC5 (#A07789), анти-CD45-Pacific Blue (#A74763), анти-CD19-AF750 (#A94681) и анти-Vb8-FITC (#IM1233) (все от Beckman-Coulter) и анти-TIGIT-APC (клон MBSA43, ebiosciences # 17-9500-42). Проточно-цитометрические анализы образцов пациентов с синдромом Сезари выполняли на приборе CytoFlex (Beckman-Coulter). Данные были проанализированы с помощью программного обеспечения FloJo (FlowJo, LLC).

Типичный пример показан на фиг. 30А. Стратегия стробирования для этого донора, имеющего злокачественный клон TCR-Vb8, продемонстрирована на фиг. 30А, где злокачественные клетки представляют собой CD45⁺CD3⁺CD4⁺Vb8⁺, а нормальные CD4⁺ Т-клетки представляют собой CD45⁺CD3⁺CD4⁺Vb8⁻. Сильная экспрессия TIGIT наблюдается на злокачественных CD4⁺ Т-клетках по сравнению с нормальными CD4⁺ Т-клетками (соответствующие MFI 4987 и 999) (фиг. 30В).

Аналогичным образом, анализы проточной цитометрии были выполнены для оценки экспрессии TIGIT на нормальных и злокачественных В-клетках в образцах костного мозга от пациентов с ХЛЛ. Образцы окрашивали следующей панелью антител: LVD efluor 780 (eBioscience 65-0865-14), анти-CD45-BB515 (клон HI30, BD Horizon 564585), анти-CD5-BV510 (клон UCHT2, Biolegend 363381), анти-CD19-BV711 (клон SJ25C1, BD Horizon 563036) и анти-TIGIT-PE (клон MBSA43, eBioscience E13456-108). Получение было выполнено на FACS Fortessa (BD Biosciences) и проанализировано с помощью программного обеспечения FlowJo (FlowJo, LLC). Жизнеспособные клетки были стробированы на прямом и боковом рассеянии. Различные подмножества клеток были стробированы следующим образом: CD45⁺ CD19⁻ CD5⁻ (нормальные В-клетки) и CD45⁺ CD19⁻ CD5⁺ (злокачественные В-ХЛЛ).

Иллюстративный пример показан на фиг. 31 со стратегией стробирования, показанной на фиг. 3А. Высокая доля злокачественных В-ХЛЛ клеток положительна для TIGIT (75%), в отличие от нормальных В-клеток (1%) (MFI 1440 и 810 соответственно) (фиг. 31В).

В целом, полученные данные демонстрируют, что опухолевые клетки экспрессируют TIGIT при определенных показаниях рака крови.

Пример 27. Противоопухолевая активность антагонистического анти-TIGIT антитела в монотера-

пии на модели лимфомы Т-клеток мыши.

Для этого эксперимента EL4 Т-клетки клеток лимфомы (ATCC® TIB-39™) были сконструированы для стабильной экспрессии TIGIT мыши (EL4-mTIGIT). Клетки EL4, трансдуцированные сходным вектором, кодирующим GFP, использовали в качестве контроля (EL4-GFP). Пулы клеток субклонировали для получения клонов EL4-mTIGIT и EL4-GFP. Используемое анти-TIGIT антитело представляло собой модифицированную версию антитела 29527 (модифицированное таким образом, что остаток 27 VH FR3 мутировал из L в V и где остаток 6 VH FR4 мутировал из M в T) и продуцировался на изоците IgG1 человека. Самкам мышей Balb/c в течение 8 недель инокулировали подкожно 1.000.000 клеток EL4-mTIGIT или 200.000 клеток EL4-GFP. На 7-й день после инокуляции, когда объемы опухолей были в среднем около 110 мм³, мышей рандомизировали в группах лечения с равным объемом опухоли (n=15 на группу для EL4-mTIGIT и n=10 на группу для EL4-GFP). Мышей обрабатывали 200 мкг анти-TIGIT или антителом изотипического контроля (hIgG1, BioXcell) путем внутривенных инъекций на 7, 10, 13 и 16 день после инокуляции опухоли. Рост опухолей контролировали, и объемы опухолей измеряли с помощью электронных штангенциркулей три раза в неделю с 7-го по 26-й день. Мышей умерщвляли, когда объем опухоли превышал 2000 мм³. Кривые роста опухолей статистически анализировали с помощью линейной смешанной модели. Различия между группами лечения оценивались путем тестирования взаимодействия времени*группы лечения.

Фиг. 32 иллюстрирует кривые роста опухоли у мышей, инокулированных EL4-mTIGIT (AC) или EL4-GFP (DF). Представлены средние кривые роста опухоли (A и D), а также отдельные кривые роста опухоли для мышей, которым вводили изотипический контроль hIgG1 (B и E) или антагонистическое а-TIGIT Ат (C и F). У мышей, инокулированных клетками EL4-mTIGIT, наблюдалось значительное подавление роста опухоли при лечении анти-TIGIT Ат по сравнению с группой, обработанной изотипическим контролем (p<0,001). Принимая во внимание, что в группе, получавшей антитело изотипического контроля, 3 из 15 мышей продемонстрировали контроль роста опухоли с объемом ниже 700 мм³ в конце модели, это число было увеличено до 8 из 15 мышей в группе, получавшей анти-TIGIT антитело-антагонист. Противоопухолевая эффективность или полный ответ не могли быть выявлены у мышей, несущих опухоль EL4-GFP, при сравнении лечения с а-TIGIT антителом -антагонистом изотипического контроля. Вместе эти данные демонстрируют, что а-TIGIT антитело-антагонист (hIgG1) обладает значительной противоопухолевой эффективностью в модели с опухолевыми клетками, экспрессирующими TIGIT.

Пример 28. Противоопухолевая активность антагонистических анти-TIGIT антител в сочетании с иммунными антителами контрольных точек на мышечной модели карциномы толстого кишечника CT26.

В дополнение к комбинации анти-TIGIT Ат с анти-PD1 антителом (примеры 12, 13 и 14), противоопухолевую эффективность анти-TIGIT антитела также оценивали в сочетании с антителами-агонистами, специфичными для костимулирующих молекул 4-1BB, OX40 и GITR, а также с антителом-антагонистом, специфичным для молекулы, ингибирующей контрольную точку ICOS.

Линия опухолевых клеток CT26 была приобретена у ATCC® (CRL-2638™). Самкам мышей balb/c в течение 8 недель инокулировали подкожно в правый бок 500000 клеток. На 9-й день после инокуляции, когда объемы опухолей были в среднем около 75 мм³, мышей рандомизировали в группах лечения с равным объемом опухоли (n=10 мышей на группу). Все антитела вводили внутривенно каждые 3 дня, начиная со дня рандомизации, всего 3 инъекции. Используемое анти-TIGIT антитело представляло собой модифицированную версию антитела 29527 (модифицированное таким образом, что остаток 27 VH FR3 мутировал из L в V и где остаток 6 VH FR4 мутировал из M в T) и продуцировался на изоците IgG2a мыши, который давали в дозе 20 мкг/мышь. Анти-4-1BB (клон 3H3, BioXCell, BE0239) вводили в дозе 5 мкг/мышь, а-OX-40 (клон OX-86, BioXCell, BE0031) вводили в дозе 20 мкг/мышь, а-GITR (клоны DTA-1, BioXCell, BE0063) вводили в дозе 10 мкг/мышь; и а-ICOS (клон 7E.17G9, BioXCell, BE0059) вводили в дозе 200 мкг/мышь. Рост опухолей контролировали, и объемы опухолей измеряли с помощью электронных штангенциркулей три раза в неделю с 7-го по 35-й день. Мышей умерщвляли, когда объем опухоли превышал 2000 мм³. Кривые роста опухоли статистически анализировали с помощью линейной смешанной модели на логарифмически трансформированных объемах опухоли. Различия между группами лечения оценивались путем тестирования взаимодействия времени*группы лечения. Это привело к хорошей модели, подходящей для подавляющего большинства данных, за исключением очень маленьких объемов опухоли (ниже 10 мм³). Поэтому эти небольшие объемы опухоли рассматривались как пропущенные значения. Чтобы проверить синергетический эффект, возникающий в результате объединения анти-TIGIT антитела с соответствующим антителом контрольной точки иммунитета (IC - т.е. анти-41BB, анти-OX40, анти-GITR и анти-ICOS), группы лечения перекодировали с помощью комбинации двух переменных; анти-TIGIT (да/нет) и IC (да/нет). Синергетический эффект, в дополнение к аддитивному эффекту каждой обработки (анти-TIGIT*время и IC*время), оценивали путем тестирования термина взаимодействия анти-TIGIT*IC*время.

На фиг. 33А продемонстрированы средние кривые роста опухоли на группу, а также индивидуальные кривые роста для мышей, которые получали анти-TIGIT в монотерапии или в комбинации с анти-

4-1BB. Наблюдалось значительное подавление роста опухоли у мышей, получавших анти-TIGIT + анти-4-1BB по сравнению с монотерапией анти-TIGIT или анти-4-1BB ($p=0,0005$ и $p<0,0001$ соответственно). Комбинация анти-TIGIT антител и анти-4-1BB антител дала 6/10 мышам полный ответ (опухоль $<30 \text{ мм}^3$ и считается не поддающимся измерению) по сравнению с полным ответом 1/10 или 0/10 в группах, получавших соответственно а-TIGIT или а-4-1BB в качестве единственного агента. Эти данные демонстрируют значительную противоопухолевую эффективность анти-TIGIT терапии в сочетании с анти-4-1BB для лечения предустановленных опухолей.

На фиг. 33B продемонстрированы срединные кривые роста опухоли на группу, а также индивидуальные кривые роста для мышей, которые получали анти-TIGIT в монотерапии или в комбинации с анти-OX-40. Наблюдалось значительное подавление роста опухоли у мышей, получавших анти-TIGIT + анти-OX-40 по сравнению с монотерапией анти-TIGIT или анти-OX-40 ($p=0,0002$ и $p<0,0001$ соответственно). Комбинация анти-TIGIT+анти-OX-40 достигла синергетической противоопухолевой эффективности, которая была больше, чем аддитивный эффект обеих монотерапевтических процедур ($p=0,02$). Комбинация анти-TIGIT и анти-OX-40 антител привела к тому, что у 7/10 мышей наблюдался полный ответ по сравнению с полным ответом 1/10 или 0/10 в группах, получавших соответственно а-TIGIT или а-OX-40 в качестве единственного агента. Эти данные демонстрируют значительную и синергическую противоопухолевую эффективность анти-TIGIT терапии в сочетании с анти-OX-40 для лечения предустановленных опухолей.

На фиг. 33C продемонстрированы срединные кривые роста опухоли на группу, а также индивидуальные кривые роста для мышей, которые получали анти-TIGIT в монотерапии или в комбинации с анти-GITR. Наблюдалось значительное подавление роста опухоли у мышей, получавших анти-TIGIT + анти-GITR по сравнению с монотерапией анти-TIGIT или анти-GITR ($p<0,0001$). Комбинация анти-TIGIT+анти-GITR достигла синергетической противоопухолевой эффективности, которая была больше, чем аддитивный эффект обеих монотерапевтических процедур ($p=0,01$). Комбинация анти-TIGIT и анти-GITR антител привела к тому, что у 6/10 мышей наблюдался полный ответ по сравнению с 1/10 или 0/10 в группах, получавших соответственно анти-TIGIT или анти-GITR в качестве единственного агента. Эти данные демонстрируют значительную и синергическую противоопухолевую эффективность анти-TIGIT терапии в сочетании с анти-GITR для лечения предустановленных опухолей.

На фиг. 33D продемонстрированы срединные кривые роста опухоли на группу, а также индивидуальные кривые роста для мышей, которые получали анти-TIGIT в монотерапии или в комбинации с анти-ICOS. Наблюдалось значительное подавление роста опухоли у мышей, получавших анти-TIGIT + анти-ICOS по сравнению с монотерапией анти-TIGIT или анти-ICOS ($p=0,003$ и $p=0,0001$, соответственно). Комбинация анти-TIGIT и анти-ICOS антител привела к тому, что у 1/10 мышей наблюдался полный ответ (где опухоль составляет $<30 \text{ мм}^3$ и считается не поддающейся измерению) по сравнению с 1/10 или 0/10 в группах, получавших соответственно анти-TIGIT или анти-ICOS антитела в качестве единственного агента. Эти данные демонстрируют значительную и синергическую противоопухолевую эффективность анти-TIGIT терапии в сочетании с анти-ICOS для лечения предустановленных опухолей.

Пример 29. Активность антагонистического анти-TIGIT антитела на $\gamma\delta$ Т-клетках.

$\gamma\delta$ (гамма-дельта или g/d) Т-клетки представляют собой популяцию необычных Т-клеток с описанной противоопухолевой активностью (Zhao et al. 2018. *J Transl Med.* 16:122) и противовирусной активностью (например, ЦМВ-инфекция), а также причастны к аутоиммунным заболеваниям (Malik S et al. 2016. *Front Immunol.* 7:14).

Анализ с помощью проточной цитометрии проводился для оценки экспрессии TIGIT на $\gamma\delta$ Т-клетках на МКПК, только что выделенных от здоровых людей с серонегативным или серопозитивным статусом питомагаловируса (ЦМВ) (статус ЦМВ оценивался EFS Nouvelle Aquitaine, Бордо, Франция). Клетки окрашивали в соответствии с инструкцией производителя, используя отфильтрованный буфер FACS (ФСБ + 2 мМ ЭДТА + 0,1% БСА). Получение было выполнено на FACS Fortessa (BD Biosciences) и проанализировано с помощью программного обеспечения BD FACS DIVA (BD Biosciences). Клетки были стробированы на прямом и боковом рассеянии и жизнеспособности. $\gamma\delta$ Т-клетки были стробированы следующим образом: $\text{CD3}^+ \text{TCR}\gamma\delta^+ \text{V}\delta 2^-$ ($\text{V}\delta 2^-$ $\gamma\delta$ Т-клетки) с использованием следующих антител: анти-TCR $\gamma\delta$ APC, клон REA591 #130-109-280 от Miltenyi; анти-TCR $\text{V}\delta 2$ -PE-Vio 770, клон REA771, #130-111-012 от Miltenyi; BV421 мышиное CD3 анти-человеческое, клон UCHT1, #560365 от BD Biosciences; набор жизнеспособности Zombie Aqua Fixable, #423101 от Biolegend.

Подобно обычным $\alpha\beta$ Т-клеткам, необычные $\text{V}\delta 2^-$ $\gamma\delta$ Т-клетки экспрессируют TIGIT как в ЦМВ-негативных, так и в позитивных популяциях людей (анти-TIGIT, клон MBSA43, #12-98500-42 от eBioscience) (фиг. 34A). Чтобы охарактеризовать функциональные последствия блокирования TIGIT-рецептора в этой популяции клеток, магнитно-выделенные $\text{V}\delta 1^+$ $\gamma\delta$ Т-клетки (анти-TCR $\text{Vd}1$ -FITC, клон REA173 #130-100-532 и анти-FITC Microbeads #130-048-701 как из Miltenyi) или общие МКПК от ЦМВ-позитивных доноров активировали анти- $\text{V}\delta 1$ (10 мкг/мл) (клон R9.1, #IM1761 от Beckman Coulter) и ИЛ-15 (20 нг/мл, #200-15-50UG от Peprotech), ИЛ-2 (100 Ед/мл, #200-02-1MG Peprotech) дополнительно добавляли к изолированным $\text{V}\delta 1^+$ $\gamma\delta$ Т-клеткам в присутствии или в отсутствие TIGIT-лиганда CD155

(#9174-CD-050 от R&D Systems). На фиг. 34В продемонстрировано дозозависимое снижение секреции ИФН γ (набор ИФА, #3420-1h-20 от Mabtech), опосредованное добавлением TIGIT-лиганда CD155 (0, 0,1, 1 и 10 мкг/мл) с достижением максимального ингибирования в концентрации 1 мкг/мл CD155. Добавление анти-TIGIT Ат клона 31282 (10 мкг/мл) полностью восстанавливает продукцию ИФН γ до уровня, равного или более высокого, по сравнению с состоянием без лиганда CD155, тогда как изотипический контроль человека IgG1 оказывает очень ограниченный эффект. На фиг. 34С продемонстрирован сходный ингибирующий эффект, опосредованный CD155 (10 мкг/мл) после активации анти-V δ 1 общих МКПК и полного восстановления секреции ИФН γ при добавлении к смеси α -TIGIT клона 31282. Эти данные демонстрируют, что, подобно $\alpha\beta$ Т-клеткам, активность $\gamma\delta$ Т-клеток может быть нарушена путем лигирования CD155 с TIGIT, и что анти-TIGIT антитела полностью предотвращают это ингибирование.

Перечень последовательностей

<110> ADIMAB LLC

<120> АНТИ-TIGIT АНТИТЕЛА

<130> NLW/P153274WO00

<140> PCT/US2018043968

<141> 2018-07-26

<150> US62/606159

<151> 2017-07-27

<150> EP17184102.6

<151> 2017-07-31

<150> BE20175535

<151> 2017-07-31

<150> US62/660640

<151> 2018-04-20

<160> 370

<170> PatentIn версия 3,5

<210> 1

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 1

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser
1 5

<210> 2

<211> 17

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 2

Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 3
 <211> 20
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 3

Ala Arg Val Ser Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Lys Leu Arg Trp Ala Glu
 1 5 10 15

Tyr Phe Gln His
 20

<210> 4
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Phe Thr Phe Glu Ser Tyr Gly Met Val
 1 5

<210> 5
 <211> 17
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 5

Ser Ile Leu Tyr Asp Gly Ser Asn Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 6
 <211> 20
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 6

Ala Arg Val Ser Tyr Tyr Tyr Asp Ser Val Glu Leu Arg Trp Ala Glu
 1 5 10 15

Tyr Phe Gln His
 20

<210> 7
 <211> 9

<212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 7

Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr Met His
 1 5

<210> 8
 <211> 17
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 8

Val Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 9
 <211> 14
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 9

Ala Arg Asp His Ser Asp Tyr Trp Ser Gly Ile Leu Asp Val
 1 5 10

<210> 10
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 10

Tyr Thr Phe Glu Lys Tyr Tyr Met His
 1 5

<210> 11
 <211> 17
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 11

Val Ile Gly Pro Ser Gly Ala Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 12
 <211> 14
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 12

Ala Arg Asp His Ser Asp Tyr Trp Ser Gly Ile Leu His Ser
 1 5 10

<210> 13
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 13

Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr Met His
 1 5

<210> 14
 <211> 17
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 14

Val Ile Gly Pro Ser Gly Ala Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 15
 <211> 14
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 15

Ala Arg Asp His Ser Asp Tyr Trp Ser Gly Ile Met Glu Val
 1 5 10

<210> 16
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 16

Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr Met His
 1 5

<210> 17
 <211> 17
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 17

Val Ile Gly Pro Ser Gly Ala Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 18
 <211> 14
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 18

Ala Arg Asp His Ser Asp Tyr Trp Ser Gly Ile Met Glu Val
 1 5 10

<210> 19
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 19

Tyr Ser Ile Ser Ser Gly Tyr Tyr Trp Ala
 1 5 10

<210> 20
 <211> 16
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 20

Ser Ile Tyr His Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 21
 <211> 17
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 21

Ala Ile Glu Gly Ala Asn Tyr Tyr Asp Phe Gly Tyr Val Ala Phe Asp
 1 5 10 15

Ile

<210> 22
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 22

Gly Ser Ile Ser Ser Gly Ser Tyr Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 23
 <211> 16
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 23

Ser Ile Phe Arg Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Glu Ser
 1 5 10 15

<210> 24
 <211> 17
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 24

Ala Ile Glu Gly Ala Asn Phe Lys Asp Phe Gly Tyr Val Ala Phe Asp
 1 5 10 15

Ile

<210> 25
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 25

Gly Ser Ile Ser Ser Ser Arg Tyr Tyr Trp Ala
 1 5 10

<210> 26
 <211> 16
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 26

Ser Ile Gly Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 27
 <211> 17
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 27

Ala Ile Glu Gly Ala Asn Phe Arg Asp Phe Gly Tyr Val Ala Phe Asp
 1 5 10 15

Ile

<210> 28
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 28

Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser
 1 5

<210> 29
 <211> 17
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 29

Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 30
 <211> 15
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 30

Ala Arg Leu His Leu Gly Ser Ser Ala Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10 15

<210> 31
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 31

Gly Thr Phe Gln Asn Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 32
<211> 17
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 32

Val Ile Val Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 33
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 33

Ala Arg Leu His Leu Gly Gln Lys Ala Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 34
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 34

Phe Thr Phe Gly Asp Tyr Ala Met His
1 5

<210> 35
<211> 17
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 35

Gly Ile Thr Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 36
<211> 12
<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 36

Ala Lys Pro Val Pro Lys Ser Arg Gly Leu Asp Val
1 5 10

<210> 37

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 37

Phe Thr Phe Arg Asp Tyr Ala Met His
1 5

<210> 38

<211> 17

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 38

Gly Ile Thr Trp Asn Ser Gly Leu Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 39

<211> 12

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 39

Ala Lys Pro Val Pro Arg Leu Arg Gly Leu Asp Val
1 5 10

<210> 40

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 40

Phe Thr Phe Gly Ser Tyr Tyr Met His
1 5

<210> 41

<211> 17

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 41

Val Ile Trp Pro Asp Gly Ser Asn Lys Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 42

<211> 12

<212> БЕЛЮК

<213> Homo sapiens

<400> 42

Ala Lys Pro Val Pro Lys Ser Arg Ala Leu Asp Val
 1 5 10

<210> 43

<211> 9

<212> БЕЛЮК

<213> Homo sapiens

<400> 43

Phe Thr Phe Ser Ser Ser Tyr Met His
 1 5

<210> 44

<211> 17

<212> БЕЛЮК

<213> Homo sapiens

<400> 44

Val Ile Gly Ala Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Glu
 1 5 10 15

Gly

<210> 45

<211> 12

<212> БЕЛЮК

<213> Homo sapiens

<400> 45

Ala Lys Pro Val Pro Arg Arg Arg Gly Leu Asp Val
 1 5 10

<210> 46

<211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 46

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 47
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 47

Asp Ala Ser Lys Arg Ala Thr
 1 5

<210> 48
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 48

Gln Gln Val His Asn Phe Pro Leu Thr
 1 5

<210> 49
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 49

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 50
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 50

Asp Ala Ser Lys Arg Ala Thr
 1 5

<210> 51
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 51

Gln Gln Val His Asn Phe Pro Leu Thr
1 5

<210> 52
<211> 12
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 52

Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 53
<211> 7
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 53

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 54
<211> 9
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 54

Gln Gln Tyr Phe Ser Pro Pro Trp Thr
1 5

<210> 55
<211> 12
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 55

Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 56
<211> 7
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 56

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 57
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 57

Gln Gln Tyr Phe Ser Pro Pro Trp Thr
 1 5

<210> 58
 <211> 12
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 58

Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 59
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 59

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5

<210> 60
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 60

Gln Gln Tyr Phe Ser Pro Pro Trp Thr
 1 5

<210> 61
 <211> 12
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 61

Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 62
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 62

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 63

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 63

Gln Gln Tyr Phe Ser Pro Pro Trp Thr
1 5

<210> 64

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 64

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 65

<211> 7

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 65

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr
1 5

<210> 66

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 66

Gln Gln Ser Pro Pro Trp Pro Arg Thr
1 5

<210> 67

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 67

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 68
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 68

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr
 1 5

<210> 69
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 69

Gln Gln Ser Pro Pro Trp Pro Arg Thr
 1 5

<210> 70
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 70

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala
 1 5 10

<210> 71
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 71

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr
 1 5

<210> 72
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 72

Gln Gln Ser Pro Pro Trp Pro Arg Thr
 1 5

<210> 73
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 73

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 74

<211> 7

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 74

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 75

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 75

Gln Gln Arg Tyr Val Phe Pro Pro Thr
1 5

<210> 76

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 76

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 77

<211> 7

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 77

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 78

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 78

Gln Gln Arg Tyr Val Phe Pro Pro Thr
1 5

<210> 79
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 79

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
 1 5 10

<210> 80
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 80

Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5

<210> 81
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 81

Gln Gln Ala Phe Tyr Leu Pro Trp Thr
 1 5

<210> 82
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 82

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
 1 5 10

<210> 83
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 83

Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5

<210> 84
 <211> 9
 <212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 84

Gln Gln Ala Phe Tyr Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 85

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 85

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 86

<211> 7

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 86

Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 87

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 87

Gln Gln Ala Phe Tyr Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 88

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 88

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 89

<211> 7

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 89

Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 90
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 90

Gln Gln Ala Phe Tyr Leu Pro Trp Thr
 1 5

<210> 91
 <211> 26
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 91

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 20 25

<210> 92
 <211> 14
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 92

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 1 5 10

<210> 93
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 93

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 94
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 94

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 95

<211> 26

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 95

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
20 25

<210> 96

<211> 14

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 96

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10

<210> 97

<211> 30

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 97

Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 98

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 98

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 99

<211> 26

045372

<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 99

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
20 25

<210> 100
<211> 14
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 100

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 101
<211> 30
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 101

Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 102
<211> 11
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 102

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 103
<211> 26
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 103

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 20 25

<210> 104
 <211> 14
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 104

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10

<210> 105
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 105

Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 106
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 106

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 107
 <211> 26
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 107

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 20 25

<210> 108
 <211> 14
 <212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 108

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 109

<211> 30

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 109

Arg Val Thr Leu Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 110

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 111

<211> 26

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 111

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
20 25

<210> 112

<211> 14

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 112

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 113
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 113

Arg Val Thr Leu Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 114
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 114

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 115
 <211> 26
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 115

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly
 20 25

<210> 116
 <211> 14
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 116

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 1 5 10

<210> 117
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 117

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys

<211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 122

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 123
 <211> 26
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 123

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly
 20 25

<210> 124
 <211> 14
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 124

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 1 5 10

<210> 125
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 125

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Thr Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 126
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 126

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 127
 <211> 26
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 127

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 20 25

<210> 128
 <211> 14
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 128

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10

<210> 129
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 129

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 130
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 130

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 131
 <211> 26
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 131

045372

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 20 25

<210> 132
 <211> 14
 <212> БЕЛЮК
 <213> Homo sapiens

<400> 132

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10

<210> 133
 <211> 30
 <212> БЕЛЮК
 <213> Homo sapiens

<400> 133

Arg Val Thr Val Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 134
 <211> 11
 <212> БЕЛЮК
 <213> Homo sapiens

<400> 134

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 135
 <211> 26
 <212> БЕЛЮК
 <213> Homo sapiens

<400> 135

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 20 25

<210> 136
 <211> 14
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 136

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
 1 5 10

<210> 137
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 137

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 138
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 138

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 139
 <211> 26
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 139

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 20 25

<210> 140
 <211> 14
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 140

045372

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
 1 5 10

<210> 141
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 141

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 142
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 142

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 143
 <211> 26
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 143

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 20 25

<210> 144
 <211> 14
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 144

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 1 5 10

<210> 145
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 145

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 146

<211> 11

<212> BEJOK

<213> Homo sapiens

<400> 146

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 147

<211> 26

<212> BEJOK

<213> Homo sapiens

<400> 147

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 20 25

<210> 148

<211> 14

<212> BEJOK

<213> Homo sapiens

<400> 148

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 1 5 10

<210> 149

<211> 30

<212> BEJOK

<213> Homo sapiens

<400> 149

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys

045372

20

25

30

<210> 150
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 150

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 151
 <211> 23
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 151

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
 20

<210> 152
 <211> 15
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 152

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 153
 <211> 32
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 153

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 154
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 154

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 155

<211> 23

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 155

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
 20

<210> 156

<211> 15

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 156

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 157

<211> 32

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 157

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 158

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 158

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 159

<211> 23

<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 159

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
20

<210> 160
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 160

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 161
<211> 32
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 161

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 162
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 162

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 163
<211> 23
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 163

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
20

<210> 164
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 164

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 165
<211> 32
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 165

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 166
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 166

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 167
<211> 23
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 167

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
20

<210> 168
<211> 15
<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 168

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 169

<211> 32

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 169

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 170

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 170

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 171

<211> 23

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 171

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
20

<210> 172

<211> 15

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 172

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 173
 <211> 32
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 173

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 174
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 174

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 175
 <211> 23
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 175

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
 20

<210> 176
 <211> 15
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 176

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 177
 <211> 32
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 177

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr

045372

1 5 10 15
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 178
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 178

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 179
<211> 23
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 179

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
 20

<210> 180
<211> 15
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 180

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 181
<211> 32
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 181

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 182

<211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 182

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 183
 <211> 23
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 183

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
 20

<210> 184
 <211> 15
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 184

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 185
 <211> 32
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 185

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 186
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 186

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 187
 <211> 23
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 187

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20

<210> 188
 <211> 15
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 188

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 189
 <211> 32
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 189

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 190
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 190

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 191
 <211> 23
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 191

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20

<210> 192
 <211> 15
 <212> БЕЛЮК
 <213> Homo sapiens

<400> 192

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 193
 <211> 32
 <212> БЕЛЮК
 <213> Homo sapiens

<400> 193

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 194
 <211> 10
 <212> БЕЛЮК
 <213> Homo sapiens

<400> 194

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 195
 <211> 23
 <212> БЕЛЮК
 <213> Homo sapiens

<400> 195

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20

<210> 196
 <211> 15
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 196

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 197
 <211> 32
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 197

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 198
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 198

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 199
 <211> 23
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 199

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20

<210> 200
 <211> 15
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 200

045372

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 201
 <211> 32
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 201

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 202
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 202

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 203
 <211> 23
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 203

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20

<210> 204
 <211> 15
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 204

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 205
 <211> 32
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 205

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 206

<211> 10

<212> БЕЖОК

<213> Homo sapiens

<400> 206

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 207

<211> 23

<212> БЕЖОК

<213> Homo sapiens

<400> 207

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20

<210> 208

<211> 15

<212> БЕЖОК

<213> Homo sapiens

<400> 208

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 209

<211> 32

<212> БЕЖОК

<213> Homo sapiens

<400> 209

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys

045372

20

25

30

<210> 210
 <211> 10
 <212> БЕЖОК
 <213> Homo sapiens

<400> 210

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 211
 <211> 127
 <212> БЕЖОК
 <213> Homo sapiens

<400> 211

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Val Ser Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Lys Leu Arg Trp Ala Glu
 100 105 110

Tyr Phe Gln His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 212
 <211> 107
 <212> БЕЖОК
 <213> Homo sapiens

<400> 212

045372

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Lys Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Val His Asn Phe Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 213

<211> 127

<212> БЕЖЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 213

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Glu Ser Tyr
20 25 30

Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Ser Ile Leu Tyr Asp Gly Ser Asn Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Ser Tyr Tyr Tyr Asp Ser Val Glu Leu Arg Trp Ala Glu

045372

100

105

110

Tyr Phe Gln His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 214

<211> 107

<212> BEJOK

<213> Homo sapiens

<400> 214

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Lys Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Val His Asn Phe Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 215

<211> 121

<212> BEJOK

<213> Homo sapiens

<400> 215

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

045372

Gly Val Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp His Ser Asp Tyr Trp Ser Gly Ile Leu Asp Val Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 216

<211> 108

<212> BEJOK

<213> Homo sapiens

<400> 216

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Phe Ser Pro Pro
 85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 217

<211> 121

<212> BEJOK

<213> Homo sapiens

<400> 217

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Glu Lys Tyr
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Val Ile Gly Pro Ser Gly Ala Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp His Ser Asp Tyr Trp Ser Gly Ile Leu His Ser Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 218

<211> 108

<212> BEJIOK

<213> Homo sapiens

<400> 218

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Phe Ser Pro Pro
 85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 219
 <211> 121
 <212> BEJOK
 <213> Homo sapiens

<400> 219

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Val Ile Gly Pro Ser Gly Ala Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp His Ser Asp Tyr Trp Ser Gly Ile Met Glu Val Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 220
 <211> 108
 <212> BEJOK
 <213> Homo sapiens

<400> 220

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

045372

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Phe Ser Pro Pro
 85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 221

<211> 121

<212> BEJOK

<213> Homo sapiens

<400> 221

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Val Ile Gly Pro Ser Gly Ala Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp His Ser Asp Tyr Trp Ser Gly Ile Met Glu Val Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

045372

115

120

<210> 222
 <211> 108
 <212> BEJOK
 <213> Homo sapiens

<400> 222

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Phe Ser Pro Pro
 85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 223
 <211> 124
 <212> BEJOK
 <213> Homo sapiens

<400> 223

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Gly
 20 25 30

Tyr Tyr Trp Ala Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Ile Gly Ser Ile Tyr His Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

045372

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ile Glu Gly Ala Asn Tyr Tyr Asp Phe Gly Tyr Val Ala Phe Asp
100 105 110

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 224

<211> 107

<212> BEJOK

<213> Homo sapiens

<400> 224

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Pro Pro Trp Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 225

<211> 125

<212> BEJOK

<213> Homo sapiens

<400> 225

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 227
 <211> 125
 <212> BEJOK
 <213> Homo sapiens

<400> 227

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
 20 25 30

Arg Tyr Tyr Trp Ala Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Gly Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Thr Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Ile Glu Gly Ala Asn Phe Arg Asp Phe Gly Tyr Val Ala Phe
 100 105 110

Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 228
 <211> 107
 <212> BEJOK
 <213> Homo sapiens

<400> 228

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30

045372

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Pro Pro Trp Pro Arg
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 229

<211> 122

<212> BEJOK

<213> Homo sapiens

<400> 229

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Leu His Leu Gly Ser Ser Ala Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 230

045372

<211> 107
 <212> BEJOK
 <213> Homo sapiens

<400> 230

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Tyr Val Phe Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 231
 <211> 122
 <212> BEJOK
 <213> Homo sapiens

<400> 231

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Gln Asn Tyr
 20 25 30
 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Val Ile Val Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Val Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

045372

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu His Leu Gly Gln Lys Ala Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 232

<211> 107

<212> BEJOK

<213> Homo sapiens

<400> 232

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Tyr Val Phe Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 233

<211> 119

<212> BEJOK

<213> Homo sapiens

<400> 233

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Asp Tyr

045372

20

25

30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Thr Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Pro Val Pro Lys Ser Arg Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 234

<211> 107

<212> BEJOK

<213> Homo sapiens

<400> 234

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Phe Tyr Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 235
 <211> 119
 <212> BEJOK
 <213> Homo sapiens

<400> 235

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asp Tyr
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Thr Trp Asn Ser Gly Leu Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Pro Val Pro Arg Leu Arg Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 236
 <211> 107
 <212> BEJOK
 <213> Homo sapiens

<400> 236

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

045372

Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Phe Tyr Leu Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 237

<211> 119

<212> BEJOK

<213> Homo sapiens

<400> 237

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Ile Trp Pro Asp Gly Ser Asn Lys Leu Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Pro Val Pro Lys Ser Arg Ala Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 238

<211> 107

<212> BEJOK

<213> Homo sapiens

045372

<400> 238

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Phe Tyr Leu Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 239

<211> 119

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 239

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Ile Gly Ala Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

045372

Ala Lys Pro Val Pro Arg Arg Arg Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 240
<211> 107
<212> BEJOK
<213> Homo sapiens

<400> 240

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Phe Tyr Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 241
<211> 381
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 241
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctggggggtc cctgagactc
60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt agctatggga tgagctgggt ccgccaggct
120

ccaggaagg ggctggagtg ggtggccaac ataaagcaag atggaagtga gaaatactat
180

gtggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcaactgtat

240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggcgggtg actactgcg tagagtatct
300

tactactacg acagcagcaa actacgatgg gcagaatact tccaacactg gggacagggt
360

acattggtca ccgtctcctc a
381

<210> 242

<211> 321

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 242

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc
60

ctctcctgca gggccagtca gagtgtagc agctacttag cctggtacca acagaaacct
120

ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaaa gggccactgg catcccagcc
180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct
240

gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag gtccacaatt tcctctcac ttttggcgga
300

gggaccaagg ttgagatcaa a
321

<210> 243

<211> 381

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 243

gaagtccagc tgggtggaatc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc
60

tcctgtgcag cgtctggatt caccttcgag agctatggca tggtttgggt ccgccaggcc
120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcatcg atattgtatg atggaagtaa tagatactat
180

gcagactccg tgaagggccg attcaccgtc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat
240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggcgggtg actactgcg tagagtatct
300

tactactacg acagcgttga gctacgatgg gcagaatact tccaacactg gggacagggt
360

acattggtca ccgtctcctc a
381

<210> 244
<211> 321
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 244
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc
60

ctctcctgca gggccagtca gagtgtagc agctacttag cctggtacca acagaaacct
120

ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaaa gggccactgg catcccagcc
180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct
240

gaagatthtg cagthtatta ctgtcagcag gtccacaatt tccctctcac thttggcgga
300

gggaccaagg ttgagatcaa a
321

<210> 245
<211> 363
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 245
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt
60

tcctgcaagg catctggata caccttcacc agctactata tgcactgggt gcgacaggcc
120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggagtc atcaacccta gtggtggtag cacaagctac
180

gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accagggaca cgtccacgag cacagtctac
240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggcgggtg actactgcgc cagagaccac
300

tccgactact ggagcggaat actagacgta tggggtcagg gtacaatggt caccgtctcc
360

tca
363

<210> 246
<211> 324

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 246

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc
60

ctctcctgca gggccagtca gagtgtagg agcagctact tagcctggta ccagcagaaa
120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca
180

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag
240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtacttca gtcctccttg gacttttggc
300

ggagggacca aggttgagat caaa
324

<210> 247

<211> 363

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 247

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt
60

tcttgcaagg catctggata caccttcgag aagtactata tgcactgggt gcgacaggcc
120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggagtg atcggtccta gtggtgctag cacaagctac
180

gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accagggaca cgtccacgag cacagtctac
240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggcgggtg actactgcgc cagagaccac
300

tccgactact ggagcggaat actacattcg tggggtcagg gtacaatggt caccgtctcc
360

tca
363

<210> 248

<211> 324

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 248

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc
60

045372

ctctcctgca gggccagtca gagggttagg agcagctact tagcctggta ccagcagaaa
120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca
180

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag
240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtacttca gtcctccttg gacttttggc
300

ggagggacca aggttgagat caaa
324

<210> 249

<211> 363

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 249

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt
60

tcttgcaagg catctggata caccttact agctactata tgcactgggt gcgacaggcc
120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggagtg atcggtccta gtggtgctag cacaagctac
180

gcacagaagt tccagggcag agtcaccttg accagggaca cgtccacgag cacagtctac
240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggcgggtg actactgcgc cagagaccac
300

tccgactact ggagcggaat aatggaggta tggggtcagg gtacaatggt caccgtctcc
360

tca
363

<210> 250

<211> 324

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 250

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc
60

ctctcctgca gggccagtca gagggttagg agcagctact tagcctggta ccagcagaaa
120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca
180

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag

240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtacttca gtcctccttg gacttttggc
300

ggagggacca aggttgagat caaa
324

<210> 251
<211> 363
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 251
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt
60

tcctgcaagg catctggata caccttcact agctactata tgcactgggt gcgacaggcc
120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggagtg atcggtccta gtggtgctag cacaagctac
180

gcacagaagt tccagggcag agtcaccttg accagggaca cgtccacgag cacagtctac
240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggcgggtg actactgcgc cagagaccac
300

tccgactact ggagcggaat aatggaggta tggggtcagg gtacaactgt caccgtctcc
360

tca
363

<210> 252
<211> 324
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 252
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc
60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagg agcagctact tagcctggta ccagcagaaa
120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca
180

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag
240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtacttca gtcctccttg gacttttggc
300

ggagggacca aggttgagat caaa
324

<210> 253
 <211> 372
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 253
 caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc
 60

acctgcgctg tctctgggta ctccatcagc agtgggttact actgggcttg gatccggcag
 120

ccccagggga aggggctgga gtggattggg agtatctatc atagtgggag cacctactac
 180

aaccctgcc tcaagagtcg agtcaccata tcagtagaca cgtccaagaa ccagttctcc
 240

ctgaagctga gttctgtgac cgccgcagac acggcgggtg actactgcgc catagaagga
 300

gctaactact acgacttcgg atatgtagca ttcgacatat ggggtcaggg tacaatggtc
 360

accgtctcct ca
 372

<210> 254
 <211> 321
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 254
 gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc
 60

ctctcctgca gggccagtca gagtgtagc agcaacttag cctggtacca gcagaaacct
 120

ggccaggctc ccaggctcct catctatggg gcatccacca gggccactgg tatcccagcc
 180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct
 240

gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tccccccctt ggctaggac ttttggcgga
 300

gggaccaagg ttgagatcaa a
 321

<210> 255
 <211> 375
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

045372

<400> 255
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc
60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtgggagtt actacttggc gtggatccgc
120
cagccccag ggaaggggct ggagtggatt gggagtatct ttcggagtgg gagcacctac
180
tacaaccgct ccctcgagag tcgagtcacc atatcggtag acacgtccaa gaaccagttc
240
tcctgaagc tgagttctgt gaccgccgca gacacggcgg tgtactactg cgccatagaa
300
ggagctaact ttaaggactt cggatatgta gcattcgaca tatgggggtca gggtacaatg
360
gtcacccgtct cctca
375

<210> 256
<211> 321
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 256
gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc
60
ctctcctgca gggccagtca gagtgtagc agcaacttag cctggtacca gcagaaacct
120
ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatcccagcc
180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct
240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tccccccctt ggcctaggac ttttggcgga
300
gggaccaagg ttgagatcaa a
321

<210> 257
<211> 375
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 257
cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc
60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtagtaggt actactgggc gtggatccgc
120

cagccccag ggaaggggct ggagtggatt gggagtatcg ggacgagtgg gagcacctac
180

tacaaccgct ccctcaagag tcgagtcacc atatccgtag acacgtccaa gaaccagttc
240

tccctgaagc tgagttctgt gaccgccaca gacacggcgg tgtactactg cgccatagaa
300

ggagctaact ttcgggactt cggatatgta gcattcgaca tatgggggtca ggggtacaatg
360

gtcacctct cctca
375

<210> 258

<211> 321

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 258

gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc
60

ctctctgca gggccagtca gagtgtagc agcaacttag cctggtacca gcagaaacct
120

ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcattccacca gggccactgg tatcccagcc
180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcaactctca ccatcagcag cctgcagtct
240

gaagatdddg cagtttatta ctgtcagcag tccccccct ggcttaggac tdddggcgga
300

gggaccaagg ttgagatcaa a
321

<210> 259

<211> 366

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 259

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc
60

tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc
120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggagg atcatcccta tctttggtac agcaaactac
180

gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac
240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggcgggtg actactgcgc taggttgcac

300

ctgggatcca ggcctacta cggcatggat gtatggggcc aggaacaac tgtcaccgtc
360

tcctca
366

<210> 260
<211> 321
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 260
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc
60

atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca
120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca
180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct
240

gaagattttg caacttacta ctgtcagcaa agatacgtct tcctcctac ttttggcgga
300

gggaccaagg ttgagatcaa a
321

<210> 261
<211> 366
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 261
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc
60

tcctgcaagg cttctggagg caccttccag aactatgcta tcagctgggt gcgacaggcc
120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggagtt atcgtgccta tctttggtac agcaaactac
180

gcacagaagt tccagggcag agtcacggtt accgcggacg aatccacgag cacagcctac
240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggcgggtg actactgcgc taggttgcac
300

ctgggacaga aggcctacta cggcatggat gtatggggcc aggaacaac tgtcaccgtc
360

tcctca
366

<210> 262
 <211> 321
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 262
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc
 60

atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca
 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca
 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct
 240

gaagattttg caacttacta ctgtcagcaa agatacgtct tcctcctac ttttggcgga
 300

gggaccaagg ttgagatcaa a
 321

<210> 263
 <211> 357
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 263
 gaagtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc
 60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttggt gattatgcca tgcactgggt ccggcaagct
 120

ccaggggaagg gcctggagtg ggtctcaggt attacttga atagtggtag cataggctat
 180

gcgactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat
 240

ctgcaaatga acagtctgag agctgaggac acggcgttgt actactgcbc caagccagtg
 300

ccaaaatcta gaggcctaga cgtatggggt cagggtacaa tggtcaccgt ctctca
 357

<210> 264
 <211> 321
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 264
 gacatccagt tgaccagtc tccatcctcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc
 60

atcacttgtc gggcgagtca gggattagc agctggttag cctgggatca gcagaaacca
120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatggg gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca
180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct
240

gaagatthtg caacttatta ctgtcagcag gcattctacc tcccttgac ttttggcgga
300

gggaccaagg ttgagatcaa a
321

<210> 265

<211> 357

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 265

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc
60

tctgtgagc cctctggatt caccttctcg gattatgcca tgcactgggt ccggcaagct
120

ccagggaaagg gcttgagtg ggtctcaggt attacttggg atagtggttt gataggctat
180

gaggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat
240

ctgcaaatga acagtctgag agctgaggac acggcgttgt actactgagc caagccagtg
300

ccacgtttga gaggcctaga cgtatggggg caggggtacaa tggtcaccgt ctctca
357

<210> 266

<211> 321

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 266

gacatccagt tgaccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc
60

atcacttgtc gggcgagtca gggattagc agctggttag cctgggatca gcagaaacca
120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatggg gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca
180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct
240

gaagatTTTg caacttatta ctgtcagcag gcattctacc tccttggac ttttggcgga
300

gggaccaagg ttgagatcaa a
321

<210> 267
<211> 357
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 267
gaagtccagc tggTggaatc tgggggaggc gtggTccagc ctgggaggTc cctgagactc
60

tcctgtgcag cgtctggatt caccttcggg agctattata Tgcactgggt ccgccaggct
120

ccaggcaagg ggctggagTg ggtggcagTt atatggcctg atggaagTaa Taaactgtat
180

gcagactccg Tgaagggccg attcaccatc Tccagagaca attccaagaa cacgctgtat
240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggcgTtTg actactgcgc caagccagTg
300

ccaaaatcta gagcgctTga cgtatggggT cagggtacaa TggTcaccgT ctctca
357

<210> 268
<211> 321
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 268
gacatccagT TgaccagTc TccatctTcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagTcacc
60

atcactTgtc gggcgagTca ggtattagc agctggTtag cctggTatca gcagaaacca
120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatggT gcattccagTt TgcaaagTgg ggtcccatca
180

aggtTcagcg gcagTggatc Tgggacagat Ttactctca ccatcagcag cctgcagcct
240

gaagatTTTg caacttatta ctgtcagcag gcattctacc tccttggac ttttggcgga
300

gggaccaagg ttgagatcaa a
321

<210> 269
<211> 357
<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 269

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc
60

tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctcttata tgcaactgggt ccgccaggct
120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt ataggtgcgg atggaagtaa taaatactat
180

gcagactccg tggagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat
240

ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggcgttgt actactgcgc caagccagtg
300

ccacggcgta gaggcctaga cgtatggggc caggggtacaa tggtcaccgt ctccctca
357

<210> 270

<211> 321

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 270

gacatccagt tgaccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc
60

atcacttgtc gggcgagtca gggatttagc agctgggttag cctgggtatca gcagaaacca
120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatggc gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca
180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct
240

gaagattttg caacttatta ctgtcagcag gcattctacc tcccttggac ttttggcgga
300

gggaccaagg ttgagatcaa a
321

<210> 271

<211> 11

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 271

Gly Ser Ile Ser Ser Gly Ser Tyr Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 272

<211> 16

<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 272

Ser Ile Phe Arg Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Glu Ser
1 5 10 15

<210> 273
<211> 17
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 273

Ala Ile Glu Gly Ala Asn Phe Lys Asp Phe Gly Tyr Val Ala Phe Asp
1 5 10 15

Ile

<210> 274
<211> 11
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 274

Gly Ser Ile Ser Ser Gly Ser Tyr Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 275
<211> 16
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 275

Ser Ile Phe Arg Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Glu Ser
1 5 10 15

<210> 276
<211> 17
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 276

Ala Ile Glu Gly Ala Asn Phe Lys Asp Phe Gly Tyr Val Ala Phe Asp
1 5 10 15

Ile

<210> 277
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 277

Gly Ser Ile Ser Ser Gly Ser Tyr Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 278
 <211> 16
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 278

Ser Ile Phe Arg Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Glu Ser
 1 5 10 15

<210> 279
 <211> 17
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 279

Ala Ile Glu Gly Ala Asn Phe Lys Asp Phe Gly Tyr Val Ala Phe Asp
 1 5 10 15

Ile

<210> 280
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 280

Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Ile Ser
 1 5

<210> 281
 <211> 17
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 281

Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 282
 <211> 13
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 282

Ala Arg Glu Ala Gln Ser Tyr Arg Val Pro Phe Asp Ile
 1 5 10

<210> 283
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 283

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala
 1 5 10

<210> 284
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 284

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr
 1 5

<210> 285
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 285

Gln Gln Ser Pro Pro Trp Pro Arg Thr
 1 5

<210> 286
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 286

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 287

<211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 287

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5

<210> 288
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 288

Gln Gln Glu Asn Pro Arg Pro Arg Thr
 1 5

<210> 289
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 289

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala
 1 5 10

<210> 290
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 290

Phe Ala Ser Thr Arg Ala Thr
 1 5

<210> 291
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 291

Gln Gln Thr Ser Pro Trp Pro Arg Thr
 1 5

<210> 292
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 292

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala
 1 5 10

<210> 293
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 293

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr
 1 5

<210> 294
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 294

Gln Gln Tyr Ala Ile Trp Pro Pro Phe Thr
 1 5 10

<210> 295
 <211> 26
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 295

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly
 20 25

<210> 296
 <211> 14
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 296

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 1 5 10

<210> 297
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 297

045372

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 298
 <211> 11
 <212> BEJOK
 <213> Homo sapiens

<400> 298

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 299
 <211> 26
 <212> BEJOK
 <213> Homo sapiens

<400> 299

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly
 20 25

<210> 300
 <211> 14
 <212> BEJOK
 <213> Homo sapiens

<400> 300

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 1 5 10

<210> 301
 <211> 30
 <212> BEJOK
 <213> Homo sapiens

<400> 301

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 302
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 302

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 303
 <211> 26
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 303

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly
 20 25

<210> 304
 <211> 14
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 304

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 1 5 10

<210> 305
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 305

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 306
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 306

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

045372

1 5 10

<210> 307
 <211> 26
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 307

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 20 25

<210> 308
 <211> 14
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 308

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10

<210> 309
 <211> 30
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 309

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 310
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 310

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 311
 <211> 23
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 311

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
 20

<210> 312

<211> 15

<212> БЕЛЮК

<213> Homo sapiens

<400> 312

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 313

<211> 32

<212> БЕЛЮК

<213> Homo sapiens

<400> 313

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 314

<211> 10

<212> БЕЛЮК

<213> Homo sapiens

<400> 314

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 315

<211> 23

<212> БЕЛЮК

<213> Homo sapiens

<400> 315

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
 20

<210> 316
 <211> 15
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 316

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 317
 <211> 32
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 317

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 318
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 318

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 319
 <211> 23
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 319

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
 20

<210> 320
 <211> 15
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 320

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 321
 <211> 32
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 321

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 322
 <211> 10
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 322

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 323
 <211> 23
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 323

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
 20

<210> 324
 <211> 15
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 324

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 325
 <211> 32
 <212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 325

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 326

<211> 10

<212> BEJOK

<213> Homo sapiens

<400> 326

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 327

<211> 125

<212> BEJOK

<213> Homo sapiens

<400> 327

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

Ser Tyr Tyr Leu Ala Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Phe Arg Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Glu Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Ile Glu Gly Ala Asn Phe Lys Asp Phe Gly Tyr Val Ala Phe
100 105 110

Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 328
 <211> 107
 <212> BEJOK
 <213> Homo sapiens

<400> 328

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Pro Pro Trp Pro Arg
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 329
 <211> 125
 <212> BEJOK
 <213> Homo sapiens

<400> 329

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
 20 25 30

Ser Tyr Tyr Leu Ala Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Phe Arg Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

045372

Leu Glu Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Ile Glu Gly Ala Asn Phe Lys Asp Phe Gly Tyr Val Ala Phe
100 105 110

Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 330

<211> 107

<212> BEJOK

<213> Homo sapiens

<400> 330

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Glu Asn Pro Arg Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 331

<211> 125

<212> BEJOK

<213> Homo sapiens

<400> 331

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

Ser Tyr Tyr Leu Ala Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Phe Arg Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Glu Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Ile Glu Gly Ala Asn Phe Lys Asp Phe Gly Tyr Val Ala Phe
100 105 110

Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 332

<211> 107

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 332

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Phe Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Ser Pro Trp Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 333
 <211> 120
 <212> BEJOK
 <213> Homo sapiens
 <400> 333

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Ala Gln Ser Tyr Arg Val Pro Phe Asp Ile Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 334
 <211> 108
 <212> BEJOK
 <213> Homo sapiens
 <400> 334

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

045372

35 40 45
Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala Ile Trp Pro Pro
85 90 95
Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 335
<211> 375
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 335
cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc ctcggagac cctgtccctc
60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtgggagtt actacttggc gtggatccgc
120
cagccccag ggaaggggct ggagtggatt gggagtatct ttcggagtgg gagcacctac
180
tacaaccgct cctcagagag tcgagtcacc atatcggtag acacgtccaa gaaccagttc
240
tcctgaagc tgagttctgt gaccgccgca gacacggcgg tgtactactg cgccatagaa
300
ggagctaact ttaaggactt cggatatgta gcattcgaca tatgggggtca ggttacaact
360
gtcaccgtct cctca
375

<210> 336
<211> 321
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 336
gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc
60
ctctcctgca gggccagtca gagggttagc agcaacttag cctggtacca gcagaaacct
120
ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatcccagcc

180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct
240

gaagatthttg cagthttatta ctgtcagcag tccccccctt gcctaggac thttggcgga
300

gggaccaagg ttgagatcaa a
321

<210> 337

<211> 375

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 337

cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc
60

acctgcactg tctctgggtg ctccatcagc agtgggagtt actacttggc gtggatccgc
120

cagccccag ggaaggggct ggagtggatt gggagtatct ttcggagtgg gagcacctac
180

tacaaccctg cctcagagag tgcagtcacc atatcggtag acacgtccaa gaaccagttc
240

tccttgaagc tgagttctgt gaccgcccga gacacggcgg tgtactactg cgccatagaa
300

ggagctaact ttaaggactt cggatatgta gcattcgaca tatgggggtca ggggtacaact
360

gtcaccgtct cctca
375

<210> 338

<211> 321

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 338

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc
60

ctctcctgca gggccagtcagc gagtggttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct
120

ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc
180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct
240

gaagatthttg cagthttatta ctgtcagcag gaaaacccca gcctaggac thttggcgga
300

gggaccaagg ttgagatcaa a
321

<210> 339
<211> 375
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 339
cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc ctcggagac cctgtccctc
60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtgggagtt actacttggc gtggatccgc
120

cagccccag ggaaggggct ggagtggatt gggagtatct ttcggagtgg gagcacctac
180

tacaaccctg ccctcgagag tcgagtcacc atatcggtag acacgtccaa gaaccagttc
240

tccttgaagc tgagttctgt gaccgccgca gacacggcgg tgtactactg cgccatagaa
300

ggagctaact ttaaggactt cggatatgta gcattcgaca tatggggtea gggtacaact
360

gtcaccgtct cctca
375

<210> 340
<211> 321
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 340
gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc
60

ctctcctgca gggccagtaa aagtgtttcc agcaacttag cctggtacca gcagaaacct
120

ggccaggctc ccaggctcct catctatttc gcatccacca gggccaccgg tatcccagcc
180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct
240

gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag acttcgccct ggcctaggac ttttggcggg
300

gggaccaagg ttgagatcaa a
321

<210> 341
<211> 360

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 341

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc
60

tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc
120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac
180

gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac
240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggcgggtg actactgcgc cagagaggct
300

caatcctaca gggttccatt cgacatatgg ggtcagggta caatggtcac cgtctcctca
360

<210> 342

<211> 324

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 342

gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc
60

ctctcctgca gggccagtca gagtgtagc agcaacttag cctggtacca gcagaaacct
120

ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatcccagcc
180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct
240

gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tacgccatct ggctccttt cacttttggc
300

ggagggacca aggttgagat caaa
324

<210> 343

<211> 126

<212> БЕЛОК

<213> Rattus norvegicus

<400> 343

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn

045372

20

25

30

Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Gly Lys Thr Tyr Tyr Arg Phe Lys Trp Tyr Ser Asp Tyr Ala
50 55 60

Val Ser Val Lys Gly Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
65 70 75 80

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

Phe Tyr Cys Thr Arg Glu Ser Thr Thr Tyr Asp Leu Leu Ala Gly Pro
100 105 110

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 344

<211> 113

<212> БЕЛКОК

<213> Rattus norvegicus

<400> 344

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Thr Val Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Asn Asn Lys Lys Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 345
 <211> 130
 <212> BEJOK
 <213> Mus musculus

<400> 345

Gln Val His Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Ser Gly
 20 25 30

Ile Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Asp Tyr Tyr Val Ser Gly Asn Tyr Tyr Asn Val Asp Tyr
 100 105 110

Tyr Phe Phe Gly Val Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
 115 120 125

Ser Ser
 130

<210> 346
 <211> 109
 <212> BEJOK
 <213> Mus musculus

<400> 346

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

045372

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
 85 90 95

Leu Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 347

<211> 119

<212> BEJOK

<213> Mus musculus

<400> 347

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Asp Gly Ala Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Gly Pro Tyr Gly Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 348
 <211> 107
 <212> BEJOK
 <213> Mus musculus

<400> 348

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu His Ile Tyr Ser Tyr
 20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Phe Gly Ser Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 349
 <211> 118
 <212> BEJOK
 <213> Mus musculus

<400> 349

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

045372

Arg Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Gln Val Gly Leu Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 350
<211> 99
<212> BEJOK
<213> Mus musculus

<400> 350

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly

<210> 351
<211> 119
<212> BEJOK
<213> Mus musculus

<400> 351

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 353
 <211> 9
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 353

Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Leu Ile Ser
 1 5

<210> 354
 <211> 17
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 354

Gly Ile Tyr Pro Ile Phe Ala Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 355
 <211> 13
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 355

Ala Arg Glu Ala Gln Ser Tyr Arg Val Pro Phe Asp Ile
 1 5 10

<210> 356
 <211> 11
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 356

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala
 1 5 10

<210> 357
 <211> 7
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 357

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr
1 5

<210> 358
<211> 10
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 358

Gln Gln Tyr Ala Ile Trp Pro Pro Phe Thr
1 5 10

<210> 359
<211> 26
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 359

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
20 25

<210> 360
<211> 14
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 360

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 361
<211> 30
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 361

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 362
<211> 11
<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 362

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 363

<211> 23

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 363

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
20

<210> 364

<211> 15

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 364

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 365

<211> 32

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 365

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 366

<211> 10

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 366

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

045372

<210> 367
 <211> 120
 <212> BEJOK
 <213> Homo sapiens

<400> 367

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Gly Ile Tyr Pro Ile Phe Ala Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Ala Gln Ser Tyr Arg Val Pro Phe Asp Ile Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 368
 <211> 108
 <212> BEJOK
 <213> Homo sapiens

<400> 368

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

045372

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala Ile Trp Pro Pro
85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 369

<211> 360

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 369

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc
60

tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agctacctca tcagctgggt gcgacaggcc
120

cctggacaag ggcttgagt gatgggagg atctacccta tcttcgcaac agcaaactac
180

gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac
240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggcgggtg actactgcgc cagagaggct
300

caatcctaca gggttccatt cgacatatgg ggtcagggtc caatggtcac cgtctcctca
360

<210> 370

<211> 324

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 370

gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc
60

ctctcctgca gggccagtca gagggttagc agcaacttag cctggtacca gcagaaacct
120

ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatcccagcc
180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct
240

gaagatthtg cagthtatta ctgtcagcag tacgccatct ggcctccttt cactthtggc
300

ggagggacca aggttgagat caaa
324

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с TIGIT человека, причем указанное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат комбинацию HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где:

HCDR1 содержит SEQ ID NO: 16 (YTFTSYMMH),
HCDR2 содержит SEQ ID NO: 17 (VIGPSGASTSYAQKFQG),
HCDR3 содержит SEQ ID NO: 18 (ARDHSDYWSGIMEV),
LCDR1 содержит SEQ ID NO: 61 (RASQSVRSSYLA),
LCDR2 содержит SEQ ID NO: 62 (GASSRAT), и
LCDR3 содержит SEQ ID NO: 63 (QQYFSPWT).

2. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, показанную как SEQ ID NO: 221, или аминокислотную последовательность, проявляющую по меньшей мере 90, 95, 97, 98 или 99% идентичности последовательности с ней, и переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, показанную как SEQ ID NO: 222 или аминокислотную последовательность, проявляющую по меньшей мере 90, 95, 97, 98 или 99% идентичности последовательности с ней.

3. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, которое представляет собой антитело IgG человека.

4. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.3, которое представляет собой антитело IgG1 человека.

5. Выделенный полинуклеотид, кодирующий антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов.

6. Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид по п.5, функционально связанный с регуляторными последовательностями, которые обеспечивают экспрессию антитела или антигенсвязывающего фрагмента в клетке-хозяине или бесклеточной системе экспрессии.

7. Клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии по п.6.

8. Способ получения рекомбинантного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, который включает культивирование клетки-хозяина по п.7 в условиях, которые обеспечивают экспрессию антитела или антигенсвязывающего фрагмента и выделение экспрессированного антитела или антигенсвязывающего фрагмента.

9. Применение антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-4 для лечения рака.

10. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4 и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель.

11. Применение фармацевтической композиции по п.10 для лечения рака.

12. Способ стимулирования активности Т-клеток, включающий приведение в контакт популяции Т-клеток с антителом или антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп.1-4.

13. Способ стимулирования активности Т-клеток по п.12, отличающийся тем, что указанный способ осуществляют *in vivo* у субъекта-человека, где указанный субъект-человек болен раком.

14. Комбинация, содержащая анти-TIGIT антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и одно или более из химиотерапевтического агента, анти-PD1 антитела, анти-PD-L1 антитела, анти-41BB антитела, анти-OX40 антитела, анти-GITR антитела и анти-ICOS антитела, где анти-TIGIT антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4, для лечения рака.

15. Применение по п.9 или 11, где рак выбран из группы, состоящей из: острого лимфобластного лейкоза, острого миелоидного лейкоза, В-клеточной лимфомы, рака мочевого пузыря, рака крови, рака кости, опухолей головного мозга, глиомы ствола головного мозга, рака молочной железы, рака надпочечника, рака анальной области, рака эндокринной системы, рака головы или шеи, рака пищевода, рака околощитовидной железы, рака полового члена, рака тонкого кишечника, рака щитовидной железы, рака мочеиспускательного канала, рака шейки матки, рака эндометрия, рака маточных труб, рака почечной лоханки, рака влагалища, рака вульвы, хронической лимфоцитарной лейкемии, хронического миелоидного лейкоза, рака толстой кишки, рака кожи, злокачественной меланомы кожи или внутриглазного канала, эпидермоидного рака, плоскоклеточного рака головы и шеи (HNSCC), лимфомы Ходжкина, саркомы Капоши, рака почки, рака легкого, лимфоцитарной лимфомы, мезотелиомы, рака носоглотки, новообразования центральной нервной системы (ЦНС), неходжкинской лимфомы, рака яичников, рака поджелудочной железы, аденомы гипофиза, первичной лимфомы ЦНС, рака предстательной железы, рака прямой кишки, рака почки, саркомы, рака кожи, опухоли оси позвоночника, плоскоклеточного рака, рака желудка, Т-клеточной лимфомы, рака яичка и рака матки.

16. Способ по п.13, где рак выбран из группы, состоящей из: острого лимфобластного лейкоза, острого миелоидного лейкоза, В-клеточной лимфомы, рака мочевого пузыря, рака крови, рака кости, опухолей головного мозга, глиомы ствола головного мозга, рака молочной железы, рака надпочечника, рака анальной области, рака эндокринной системы, рака головы или шеи, рака пищевода, рака околощитовидной железы, рака полового члена, рака тонкого кишечника, рака щитовидной железы, рака мочеиспускательного канала, рака шейки матки, рака эндометрия, рака маточных труб, рака почечной лоханки, рака влагалища, рака вульвы, хронической лимфоцитарной лейкемии, хронического миелоидного лейкоза, рака толстой кишки, рака кожи, злокачественной меланомы кожи или внутриглазного канала, эпидермоидного рака, плоскоклеточного рака головы и шеи (HNSCC), лимфомы Ходжкина, саркомы Капоши, рака почки, рака легкого, лимфоцитарной лимфомы, мезотелиомы, рака носоглотки, новообразования центральной нервной системы (ЦНС), неходжкинской лимфомы, рака яичников, рака поджелудочной железы, аденомы гипофиза, первичной лимфомы ЦНС, рака предстательной железы, рака прямой кишки, рака почки, саркомы, рака кожи, опухоли оси позвоночника, плоскоклеточного рака, рака желудка, Т-клеточной лимфомы, рака яичка и рака матки.

17. Комбинация по п.14, где рак выбран из группы, состоящей из: острого лимфобластного лейкоза, острого миелоидного лейкоза, В-клеточной лимфомы, рака мочевого пузыря, рака крови, рака кости, опухолей головного мозга, глиомы ствола головного мозга, рака молочной железы, рака надпочечника, рака анальной области, рака эндокринной системы, рака головы или шеи, рака пищевода, рака околощитовидной железы, рака полового члена, рака тонкого кишечника, рака щитовидной железы, рака мочеиспускательного канала, рака шейки матки, рака эндометрия, рака маточных труб, рака почечной лоханки, рака влагалища, рака вульвы, хронической лимфоцитарной лейкемии, хронического миелоидного лейкоза, рака толстой кишки, рака кожи, злокачественной меланомы кожи или внутриглазного канала, эпидермоидного рака, плоскоклеточного рака головы и шеи (HNSCC), лимфомы Ходжкина, саркомы Капоши, рака почки, рака легкого, лимфоцитарной лимфомы, мезотелиомы, рака носоглотки, новообразования центральной нервной системы (ЦНС), неходжкинской лимфомы, рака яичников, рака поджелудочной железы, аденомы гипофиза, первичной лимфомы ЦНС, рака предстательной железы, рака прямой кишки, рака почки, саркомы, рака кожи, опухоли оси позвоночника, плоскоклеточного рака, рака желудка, Т-клеточной лимфомы, рака яичка и рака матки.

Последовательность CDR VH

Антитело	VH CDR1	SEQ ID NO:	VH CDR2	SEQ ID NO:	VH CDR3	SEQ ID NO:
26518	FTFSSYGMS	1	NIKQDGSSEKYYVDSVKG	2	ARVSYYYDSSKLRWAEYFQH	3
29478	FTFESYGMV	4	SILYDGSNRYADSVKG	5	ARVSYYYDSSVELRWAEYFQH	6
26452	YTFTSYMMH	7	VINPSGGSTSYAQKFQG	8	ARDHSDYWWSGILDV	9
29487	YTFEKYYMH	10	VIGPSGASTSYAQKFQG	11	ARDHSDYWWSGILHS	12
29489	YTFTSYMMH	13	VIGPSGASTSYAQKFQG	14	ARDHSDYWWSGIMEV	15
31282	YTFTSYMMH	16	VIGPSGASTSYAQKFQG	17	ARDHSDYWWSGIMEV	18
26486	YSISSGYWA	19	SIYHSGSTYYNPSLKS	20	AIEGANYYDFGYVAFDI	21
29494	GSISSGSYYLA	22	SIFRSGSTYYNPSLES	23	AIEGANFKDFGYVAFDI	24
29499	GSISSRYWA	25	SIGTSGSTYYNPSLKS	26	AIEGANFRDFGYVAFDI	27
26521	GTFSSY AIS	28	GIPIFGTANYAQKFQG	29	ARLHLGSSAYYGM DV	30
29513	GTFQNYAIS	31	VIVPIFGTANYAQKFQG	32	ARLHLGQKAYYGM DV	33
26493	FTFGDYAMH	34	GITWNSG SIGYADSVKG	35	AKPVPKSRGLDV	36
29520	FTFRDYAMH	37	GITWNSGLIGYADSVKG	38	AKPVPRLRGLDV	39
29523	FTFGSYMMH	40	VIWPDGGSNKLYADSVKG	41	AKPVPKSRALDV	42
29527	FTFSSYMMH	43	VIGADGSNKYYADSVKG	44	AKPVPRRRGLDV	45
31288	GSISSGSYYLA	271	SIFRSGSTYYNPSLES	272	AIEGANFKDFGYVAFDI	273
32919	GSISSGSYYLA	274	SIFRSGSTYYNPSLES	275	AIEGANFKDFGYVAFDI	276
32931	GSISSGSYYLA	277	SIFRSGSTYYNPSLES	278	AIEGANFKDFGYVAFDI	279
26432	GTFSSY AIS	280	GIPIFGTANYAQKFQG	281	AREAQSYRVPFDI	282
32959	GTFSSYLIS	353	GIYPIFATANYAQKFQG	354	AREAQSYRVPFDI	355

Фиг. 1

Последовательность CDR VL

Антитело	VL CDR1	SEQ ID NO:	VL CDR2	SEQ ID NO:	VL CDR3	SEQ ID NO:
26518	RASQSVSSYLA	46	DASKRAT	47	QQVHNFPPLT	48
29478	RASQSVSSYLA	49	DASKRAT	50	QQVHNFPPLT	51
26452	RASQSVRSSYLA	52	GASSRAT	53	QQYFSPPWWT	54
29487	RASQSVRSSYLA	55	GASSRAT	56	QQYFSPPWWT	57
29489	RASQSVRSSYLA	58	GASSRAT	59	QQYFSPPWWT	60
31282	RASQSVRSSYLA	61	GASSRAT	62	QQYFSPPWWT	63
26486	RASQSVSSNLA	64	GASTRAT	65	QQSPPWPRT	66
29494	RASQSVSSNLA	67	GASTRAT	68	QQSPPWPRT	69
29499	RASQSVSSNLA	70	GASTRAT	71	QQSPPWPRT	72
26521	RASQSISSYLN	73	AASSLQS	74	QQRVFPPT	75
29513	RASQSISSYLN	76	AASSLQS	77	QQRVFPPT	78
26493	RASQGISSWLA	79	GASSLQS	80	QQAFLPWT	81
29520	RASQGISSWLA	82	GASSLQS	83	QQAFLPWT	84
29523	RASQGISSWLA	85	GASSLQS	86	QQAFLPWT	87
29527	RASQGISSWLA	88	GASSLQS	89	QQAFLPWT	90
31288	RASQSVSSNLA	283	GASTRAT	284	QQSPPWPRT	285
32919	RASQSVSSYLA	286	DASNRAT	287	QQENPRPRT	288
32931	RASKSVSSNLA	289	FASTRAT	290	QQTSPWPRT	291
26432	RASQSVSSNLA	292	GASTRAT	293	QQYAIWPPFT	294
32959	RASQSVSSNLA	356	GASTRAT	357	QQYAIWPPFT	358

Фиг. 2

Последовательность FR VH

Антитело	VH FR1	SEQ ID NO:	VH FR2	SEQ ID NO:	VH FR3	SEQ ID NO:	VH FR4	SEQ ID NO:
26518	EVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASG	91	WVRQAPGKGLEWVA	92	RFTISRDNAKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYC	93	WGQGT LTVSS	94
29478	EVQLVESGGGVVQPG RSLRLSCAASG	95	WVRQAPGKGLEWVA	96	RFTVSRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYC	97	WGQGT LTVSS	98
26452	QVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSCKASG	99	WVRQAPGGGLEWMG	100	RVTMTRDTSSTVYMELSSL RSEDATVYYC	101	WGQGT MVTSS	102
29487	QVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSCKASG	103	WVRQAPGGGLEWMG	104	RVTMTRDTSSTVYMELSSL RSEDATVYYC	105	WGQGT MVTSS	106
29489	QVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSCKASG	107	WVRQAPGGGLEWMG	108	RVTLTRDTSSTVYMELSSL RSEDATVYYC	109	WGQGT MVTSS	110
31282	QVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSCKASG	111	WVRQAPGGGLEWMG	112	RVTLTRDTSSTVYMELSSL RSEDATVYYC	113	WGQGT TMTSS	114
26486	QVQLQESGPGLVKPS ETLSLTCAVSG	115	WIRQPPGKGLEWIG	116	RVTISVDTSKNQFSLKLSSTV AADTAVYYC	117	WGQGT MVTSS	118
29494	QVQLQESGPGLVKPS ETLSLTCTVSG	119	WIRQPPGKGLEWIG	120	RVTISVDTSKNQFSLKLSSTV AADTAVYYC	121	WGQGT MVTSS	122
29499	QLQLQESGPGLVKPS ETLSLTCTVSG	123	WIRQPPGKGLEWIG	124	RVTISVDTSKNQFSLKLSSTV AADTAVYYC	125	WGQGT MVTSS	126
26521	QVQLVQSGAEVKKPG SSVKVSCKASG	127	WVRQAPGGGLEWMG	128	RVTITADESTSTAYMELSSL SEDTAVYYC	129	WGQGT TMTSS	130
29513	QVQLVQSGAEVKKPG SSVKVSCKASG	131	WVRQAPGGGLEWMG	132	RVTITADESTSTAYMELSSL RSEDATVYYC	133	WGQGT TMTSS	134
26493	EVQLVESGGGLVQPG RSLRLSCAASG	135	WVRQAPGKGLEWWS	136	RFTISRDNAKNSLYLQMNSL RAEDTALYYC	137	WGQGT MVTSS	138
29520	QVQLVESGGGLVQPG RSLRLSCAASG	139	WVRQAPGKGLEWWS	140	RFTISRDNAKNSLYLQMNSL RAEDTALYYC	141	WGQGT MVTSS	142
29523	EVQLVESGGGVVQPG RSLRLSCAASG	143	WVRQAPGKGLEWVA	144	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTALYYC	145	WGQGT MVTSS	146
29527	QVQLVESGGGVVQPG RSLRLSCAASG	147	WVRQAPGKGLEWVA	148	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTALYYC	149	WGQGT MVTSS	150
31288	QLQLQESGPGLVKPS ETLSLTCTVSG	295	WIRQPPGKGLEWIG	296	RVTISVDTSKNQFSLKLSSTV AADTAVYYC	297	WGQGT TMTSS	298
32919	QLQLQESGPGLVKPS ETLSLTCTVSG	299	WIRQPPGKGLEWIG	300	RVTISVDTSKNQFSLKLSSTV AADTAVYYC	301	WGQGT TMTSS	302
32931	QLQLQESGPGLVKPS ETLSLTCTVSG	303	WIRQPPGKGLEWIG	304	RVTISVDTSKNQFSLKLSSTV AADTAVYYC	305	WGQGT TMTSS	306
26432	QVQLVQSGAEVKKPG SSVKVSCKASG	307	WVRQAPGGGLEWMG	308	RVTITADESTSTAYMELSSL SEDTAVYYC	309	WGQGT MVTSS	310
32959	QVQLVQSGAEVKKPG SSVKVSCKASG	359	WVRQAPGGGLEWMG	360	RVTITADESTSTAYMELSSL SEDTAVYYC	361	WGQGT MVTSS	362

Фиг. 3

Последовательность FR VL

Антитело	VL FR1	SEQ ID NO:	VL FR2	SEQ ID NO:	VL FR3	SEQ ID NO:	VL FR4	SEQ ID NO:
26518	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	151	WYQQKPGQAPRLLIY	152	GIPARFSGSGSGTDFTLTISSEPEDFAVYYC	153	FGGGTKVEIK	154
29478	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	155	WYQQKPGQAPRLLIY	156	GIPARFSGSGSGTDFTLTISSEPEDFAVYYC	157	FGGGTKVEIK	158
26452	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	159	WYQQKPGQAPRLLIY	160	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC	161	FGGGTKVEIK	162
29487	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	163	WYQQKPGQAPRLLIY	164	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC	165	FGGGTKVEIK	166
29489	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	167	WYQQKPGQAPRLLIY	168	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC	169	FGGGTKVEIK	170
31282	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	171	WYQQKPGQAPRLLIY	172	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC	173	FGGGTKVEIK	174
26486	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC	175	WYQQKPGQAPRLLIY	176	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC	177	FGGGTKVEIK	178
29494	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC	179	WYQQKPGQAPRLLIY	180	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC	181	FGGGTKVEIK	182
29499	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC	183	WYQQKPGQAPRLLIY	184	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC	185	FGGGTKVEIK	186
26521	DIQMTQSPSSLSASVGRVITTC	187	WYQQKPGKAPKLLIY	188	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC	189	FGGGTKVEIK	190
29513	DIQMTQSPSSLSASVGRVITTC	191	WYQQKPGKAPKLLIY	192	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC	193	FGGGTKVEIK	194
26493	DIQLTQSPSSVSASVGRVITTC	195	WYQQKPGKAPKLLIY	196	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC	197	FGGGTKVEIK	198
29520	DIQLTQSPSSVSASVGRVITTC	199	WYQQKPGKAPKLLIY	200	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC	201	FGGGTKVEIK	202
29523	DIQLTQSPSSVSASVGRVITTC	203	WYQQKPGKAPKLLIY	204	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC	205	FGGGTKVEIK	206
29527	DIQLTQSPSSVSASVGRVITTC	207	WYQQKPGKAPKLLIY	208	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC	209	FGGGTKVEIK	210
31288	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC	311	WYQQKPGQAPRLLIY	312	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC	313	FGGGTKVEIK	314
32919	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	315	WYQQKPGQAPRLLIY	316	GIPARFSGSGSGTDFTLTISSEPEDFAVYYC	317	FGGGTKVEIK	318
32931	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC	319	WYQQKPGQAPRLLIY	320	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC	321	FGGGTKVEIK	322
26432	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC	323	WYQQKPGQAPRLLIY	324	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC	325	FGGGTKVEIK	326
32959	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC	363	WYQQKPGQAPRLLIY	364	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC	365	FGGGTKVEIK	366

Фиг. 4

белковые последовательности переменного домена

Антитело	VH белка	SEQ ID NO:	VL белка	SEQ ID NO:
26518	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMWVRQAPGKGLLEWVANIQQDGGSEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCARVSYYYDSSKLRWAEYFQHWGQGLTVTVSS	211	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASKRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSEPEDFAVYYCQQVHNFLTFGGGKVEIK	212
29478	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFESYGMWVRQAPGKGLLEWVASILYDGSNRYADSVKGRFTVSRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARVSYYYDSVELRWAEYFQHWGQGLTVTVSS	213	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASKRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSEPEDFAVYYCQQVHNFLTFGGGKVEIK	214
26452	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWVRQAPGQGLEWVMGVINPSSGASTSYAQKFGQGRVTMTRDSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARDHSDYWSGILDVWGQGTMVTVSS	215	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRAASQSVRSSLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLPEDFAVYYCQQYFSPWTFGGGKVEIK	216
29487	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWVRQAPGQGLEWVMGVIQPSGASTSYAQKFGQGRVTMTRDSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARDHSDYWSGILHWSWGQGMVTVSS	217	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRAASQSVRSSLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLPEDFAVYYCQQYFSPWTFGGGKVEIK	218
29489	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWVRQAPGQGLEWVMGVIQPSGASTSYAQKFGQGRVTLTRDSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARDHSDYWSGIMEVWGQGMVTVSS	219	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRAASQSVRSSLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLPEDFAVYYCQQYFSPWTFGGGKVEIK	220
31282	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWVRQAPGQGLEWVMGVIQPSGASTSYAQKFGQGRVTLTRDSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARDHSDYWSGIMEVWGQGMVTVSS	221	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRAASQSVRSSLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLPEDFAVYYCQQYFSPWTFGGGKVEIK	222
26486	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCVSGGSISSGSYYLAWIRQPPGKLEWIGSIYHSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKSSVTAADTAVYYCAIEGANYYDFGYVAFDIWGQGMVTVSS	223	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRAASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQSPWPRTFGGGKVEIK	224
29494	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCVSGGSISSGSYYLAWIRQPPGKLEWIGSIFRSGSTYYNPSLESRTISVDTSKNQFSLKSSVTAADTAVYYCAIEGANFKDFGYVAFDIWGQGMVTVSS	225	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRAASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQSPWPRTFGGGKVEIK	226

29499	QLQLQESGPGLVKPKSETLSLCTVSGGSISSSYWAMI RPPGKGLEWIGSIGTSGSTYYPNLSKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSVATADTAVVYCAIEGANFRDFGYVAFDIWQGGT MVTVSS	227	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQ KPGKAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTDFLTISSL QSEDFAVYYCQSPWPRTFSGGKVEIK	228
26521	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSSYAIWWR QAPGQGLEWVGGIPIFGTANYAQKQGRVTITADEST AYMELSSLRSEDTAVVYCARLHLGSSAYYGMVDVWQGT TVTSS	229	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQISSYLNWYQQ KPGKAPKLLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISSL QPEDFATYYCQQRVYFPPTFGGKVEIK	230
29513	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFQNYAISWWR QAPGQGLEWVGGVPIFGTANYAQKQGRVTITADEST TAYMELSSLRSEDTAVVYCARLHLGQKAYYGMVDVWQGT TVTSS	231	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQISSYLNWYQQ KPGKAPKLLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISSL QPEDFATYYCQQRVYFPPTFGGKVEIK	232
26493	EVQLVESGGGLVQPGSRSLRSCAASGFTFGDYAMHWWR QAPGKGLEWVSGITWNSGSIYADSVKGRFTISRDNKAKN SLYLQMNLSRAEDTALYYCAKVPKSRGLDVWQGGTMV TVSS	233	DIQLTQSPSSVSASVGDRTVITCRASQISSYLNWYQQ KPGKAPKLLIYGASLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISS LQPEDFATYYCQAFYLPWTFGGGKVEIK	234
29520	QVQLVESGGGLVQPGSRSLRSCAASGFTFRDYAMHWWR QAPGKGLEWVSGITWNSGLIYADSVKGRFTISRDNKAKN SLYLQMNLSRAEDTALYYCAKVPRLRGLDVWQGGTMV TVSS	235	DIQLTQSPSSVSASVGDRTVITCRASQISSYLNWYQQ KPGKAPKLLIYGASLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISS LQPEDFATYYCQAFYLPWTFGGGKVEIK	236
29523	EVQLVESGGGVVQPGSRSLRSCAASGFTFGSYMHWWR QAPGKGLEWVAVIWPDSNKLADSVKGRFTISRDNKAKN TLYLQMNLSRAEDTALYYCAKVPKSRALDVWQGGTMV TVSS	237	DIQLTQSPSSVSASVGDRTVITCRASQISSYLNWYQQ KPGKAPKLLIYGASLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISS LQPEDFATYYCQAFYLPWTFGGGKVEIK	238
29527	QVQLVESGGGVVQPGSRSLRSCAASGFTFSSYMHWWR QAPGKGLEWVAVIGADGSKNYADSVKGRFTISRDNKAKN TLYLQMNLSRAEDTALYYCAKVPKRRGLDVWQGGTMV TVSS	239	DIQLTQSPSSVSASVGDRTVITCRASQISSYLNWYQQ KPGKAPKLLIYGASLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISS LQPEDFATYYCQAFYLPWTFGGGKVEIK	240
31288	QLQLQESGPGLVKPKSETLSLCTVSGGSISSSYLAWIRPPGK LEWIGSIFRSSTYYPNLSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTA VYCAIEGANFKDFGYVAFDIWQGGTITVTVSS	327	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQA PRLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTDFLTISSLQSEDFAVYYCQ QSPWPRTFSGGKVEIK	328
32919	QLQLQESGPGLVKPKSETLSLCTVSGGSISSSYLAWIRPPGK LEWIGSIFRSSTYYPNLSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTA VYCAIEGANFKDFGYVAFDIWQGGTITVTVSS	329	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAP RLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFLTISSLQSEDFAVYYCQ ENPRPRTFSGGKVEIK	330
32931	QLQLQESGPGLVKPKSETLSLCTVSGGSISSSYLAWIRPPGK LEWIGSIFRSSTYYPNLSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTA VYCAIEGANFKDFGYVAFDIWQGGTITVTVSS	331	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQA PRLIYFASTRATGIPARFSGSGSGTDFLTISSLQSEDFAVYYCQ QTSWPRTFSGGKVEIK	332
26432	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSSYAIWWRQAPGQ GLEWVGGIPIFGTANYAQKQGRVTITADESTAYMELSSLR SEDTAVVYCAIEAQSRYRPFDIWQGGTMVTVSS	333	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQA PRLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTDFLTISSLQSEDFAVYYCQ QYAIWPPPTFSGGKVEIK	334
32959	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSSYAIWWRQAPGQ LEWVGGIPIFGTANYAQKQGRVTITADESTAYMELSSLRSE DTAVVYCAIEAQSRYRPFDIWQGGTMVTVSS	367	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQA PRLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTDFLTISSLQSEDFAVYYCQ QYAIWPPPTFSGGKVEIK	368

Фиг. 5

ДНК последовательности варибельного домена

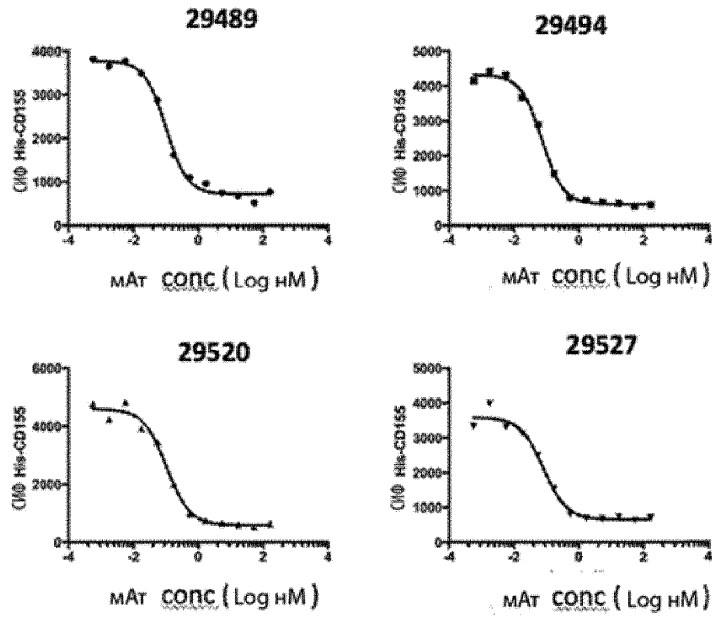
Антитело	ДНК VH	SEQ ID NO:	ДНК VL	SEQ ID NO:
26518	CAGGTCCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGCGCTGGTCCACC CTGGGGGCTCCTGAGACTCCTGTGCAGCCTCTGGATT ACCTTTAGTACTATGGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCA GGGAAGGGCTGGAGTGGGTGGCCAAACATAAAGCAAGATGG AAGTGAGAACTACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTAC CATCTCCAGAGACAAAGCCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAA GAAACGCTGAGAGCCGAGGACAGCGGGGTACTACTGCG CTAGATCTTACTACTACGACAGCAGCAAACTAGGATGG CAGAATCTTCCAACTGGGGACAGGGTACATTGGTCAACC TCTCTCA	241	GAAATTGTGTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTC TCCAGGGGAAAAGGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAG AGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGG CCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAAAAGGG CCACTGGCATCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGCTGG GACAGACTTCACTCTACCATCAGCAGCTAGAGCCTGAAG ATTTTGCAGTTTATTACTGTCAAGGCTCCACAATTTCCCTC TCACTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAAA	242
29478	GAAGTCCAGCTGGTGGAACTCTGGGGAGCGCTGGTCCAGCC TGGGAGGTCCTGAGACTCCTGTGCAGCCTCTGGATTAC CTTCGAGAGCTATGGCATGGTTGGGTCCGCCAGGCCCCAG GCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCATCGATATTGTATGATGGA AGTAATAGATACTATGCAAGCTCCGTGAAGGGCCGATTACCC GTCTCCAGAGACAATCCAAAGAACACGCTGTATCTGCAAA AAGCAGGCTGAGAGCCGAGGACAGCGGGGTACTACTGCGC TAGAGTACTTACTACTACGACAGCCTTAGGCTACGATGGCC AGAATACTTCCAACTGGGGACAGGGTACATTGGTCAACC TCTCTCA	243	GAAATTGTGTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTC TCCAGGGGAAAAGGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAG AGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGG CCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAAAAGGG CCACTGGCATCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGCTGG GACAGACTTCACTCTACCATCAGCAGCTAGAGCCTGAAG ATTTTGCAGTTTATTACTGTCAAGGCTCCACAATTTCCCTC TCACTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAAA	244
26452	CAGGTCCAGCTGGTGGAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAACCC TGGGGCTCAGTGAAGGTTTCTGCAAGGCATCTGGATACAC CTTCACAGCTACTATATGCACTGGGTGGCAGCAGGCCCTGG ACAAGGGCTTGAAGTGGATGGGAGTCAATCAACCTAGTGGT GTAGCACAAGCTACGACAGAAAGTTCCAGGGCAGAGTCAAC ATGACAGGGGACAGCTCCACGAGCACAGTCTACATGGAGCT GAGCAGCCTGAGATCTGAGGACAGCGGGGTACTACTGCGC CCAGAGACCACTCCGACTACTGGAGCGGAATACTAGACGTAT GGGGTCAAGGTACAATGGTCAAGCTCTCTCA	245	GAAATTGTGTGACAGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTC TCCAGGGGAAAAGGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAG AGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGG TGGCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAAAAGGG AGGGCCACTGCGATCCAGCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGCTGG CTGGACAGACTTCACTCTACCATCAGCAGCTAGAGCCT GAAGATTTGCAAGTATTACTGTCAAGGCTCCACAATTTCCCTC CCTTGGACTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAAA	246
29487	CAGGTCCAGCTGGTGGAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAACCC TGGGGCTCAGTGAAGGTTTCTGCAAGGCATCTGGATACAC CTTCGAGAGCTACTATATGCACTGGGTGGCAGCAGGCCCTGG GACAAGGGCTTGAAGTGGATGGGAGTATCGGTCTAGTGGT GCTAGCACAGCTACGACAGAAAGTTCCAGGGCAGAGTCAAC CATGACAGGGGACAGCTCCACGAGCACAGTCTACATGGAGC TGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACAGCGGGGTACTACTGCGC GCCAGAGACCACTCCGACTACTGGAGCGGAATACTACATCTG TGGGGTCAAGGTACAATGGTCAAGCTCTCTCA	247	GAAATTGTGTGACAGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTC TCCAGGGGAAAAGGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAG AGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGG TGGCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAAAAGGG AGGGCCACTGCGATCCAGCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGCTGG CTGGACAGACTTCACTCTACCATCAGCAGCTAGAGCCT GAAGATTTGCAAGTATTACTGTCAAGGCTCCACAATTTCCCTC CCTTGGACTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAAA	248

Антитело	ДНК VH	SEQ ID NO:	ДНК VL	SEQ ID NO:
29489	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCC TGGGGCCCTCAAGTGAAGGTTTCTGCAAGGCATCTGGATACAC CTTCACTAGCTACTATATGCACTGGGTGGCAGGCCCCCTGG ACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGTGATCGGTCTAGTGGTG CTAGCACAAAGCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACT TGACAGGGACACGTCCACGAGCAGAGTACATGGAGCTG AGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCGGTGTACTACTGCC CAGAGACACTCCGACTACTGGAGCGGAATAATGGAGGTAT GGGGTCAAGGTACAATGGTCACTCTCTCA	249	GAAATGTGTGACGACAGTCTCCAGGCCACCTGTCTTTGTC TCCAGGGGAAAAGAGCCACCTCTCTGCAAGGGCCAGTCAAG AGTGTAGGAGCAGCTACTTACCTGGTACCAGCAGAAACC TGCCAGGCTCCCAGGCTCTCATCTATGGTGCATCCAGC AGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTGAGTGGCAGTGGGT CTGGGACAGACTTCACTCTACCATCAGCAGACTGGAGCCT GAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTGACGAGTCTTCACTGCT CCTTGGACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA	250
31282	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCC TGGGGCCCTCAAGTGAAGGTTTCTGCAAGGCATCTGGATACAC CTTCACTAGCTACTATATGCACTGGGTGGCAGGCCCCCTGG ACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGTGATCGGTCTAGTGGTG TGACACAAGCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACT TGACAGGGACACGTCCACGAGCAGAGTACATGGAGCTG AGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCGGTGTACTACTGCC CAGAGACACTCCGACTACTGGAGCGGAATAATGGAGGTAT GGGGTCAAGGTACAATGGTCACTCTCTCA	251	GAAATGTGTGACGACAGTCTCCAGGCCACCTGTCTTTGTC TCCAGGGGAAAAGAGCCACCTCTCTGCAAGGGCCAGTCAAG AGTGTAGGAGCAGCTACTTACCTGGTACCAGCAGAAACC TGCCAGGCTCCCAGGCTCTCATCTATGGTGCATCCAGC AGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTGAGTGGCAGTGGGT CTGGGACAGACTTCACTCTACCATCAGCAGACTGGAGCCT GAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTGACGAGTCTTCACTGCT CCTTGGACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA	252
26486	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCC CTTCAAGCCCTGTCCCTCACTCTGCGGTGTCTGTGGTACT CCATCAGCAGTGGTACTACTGGGCTTGGATCCGCGACGCC CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATGGGAGTACTTACTATCG TGGAGCAGCTACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCCAGTCA CATATCAGTACACAGCTCCCAAGAACCAGTTCCCTGGAGTCT GAGTTCTGTGACCCGCCAGACACGGCGGTGTACTACTGCC CCATAGGAGCTACTACTACTAGCCTTCCGATATGTAGCAT TCGACATATGGGGTCAAGGTACAATGGTCACTCTCTCA	253	GAAATGTGTGACGACAGTCTCCAGGCCACCTGTCTGTGTC TCCAGGGGAAAAGAGCCACCTCTCTGCAAGGGCCAGTCAAG AGTGTAGCAGCAACTTACCTGGTACCAGCAGAAACCCTGG CCAGGCTCCCAGGCTCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGG GCCACTGGTATCCAGCCAGGTTGAGTGGCAGTGGGTCTG GGACAGATTCACCTCTACCATCAGCAGCTCCGAGTCTGAA GATTTTGCAGTGTATTACTGTGACGAGTCTCCGCCCTGGCC TAGGACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA	254
29494	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCC CTTCCGAGCCCTGTCCCTCACTCTGCGGTGTCTGTGGTACT CCATCAGCAGTGGGAGTACTACTTGGCGTGGATCCGCCAG CCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATGGGAGTACTTTCCG GAGTGGGAGCAGCTACTACAACCCCTCCCTCAGAGTCCAG TCACCATATCCGTAGACACGTCCCAAGAACCAGTTCCCTGA AGCTGAGTCTGTGACCCGCCAGACACGGCGGTGTACTACT TGGCCATAGAAGGAGCTACTTTAGGACTTCCGATATGTAG GCATTCGACATATGGGGTCAAGGTACAATGGTCACTCTCTC TCA	255	GAAATGTGTGACGACAGTCTCCAGGCCACCTGTCTGTGTC TCCAGGGGAAAAGAGCCACCTCTCTGCAAGGGCCAGTCAAG AGTGTAGCAGCAACTTACCTGGTACCAGCAGAAACCCTGG CCAGGCTCCCAGGCTCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGG GCCACTGGTATCCAGCCAGGTTGAGTGGCAGTGGGTCTG GGACAGATTCACCTCTACCATCAGCAGCTCCGAGTCTGAA GATTTTGCAGTGTATTACTGTGACGAGTCTCCGCCCTGGCC TAGGACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA	256
Антитело	ДНК VH	SEQ ID NO:	ДНК VL	SEQ ID NO:
29499	CAGTGCAGCTGCAGGAGTGGGGCCAGGACTGGTGAAGCC TTCGGAGCCCTGTCCCTCACTCTGCGGTGTCTGTGGTACT CCATCAGCAGTGGGAGTACTACTGGCGTGGATCCGCCAGC CCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATGGGAGTACTTTCCG GAGTGGGAGCAGCTACTACAACCCCTCCCTCAGAGTCCAG TCACCATATCCGTAGACACGTCCCAAGAACCAGTTCCCTGA AGCTGAGTCTGTGACCCGCCAGACACGGCGGTGTACTACT CCGCCATAGAAGGAGCTACTTTAGGACTTCCGATATGTAG GCATTCGACATATGGGGTCAAGGTACAATGGTCACTCTCTC TCA	257	GAAATGTGTGACGACAGTCTCCAGGCCACCTGTCTGTGTC TCCAGGGGAAAAGAGCCACCTCTCTGCAAGGGCCAGTCAAG AGTGTAGCAGCAACTTACCTGGTACCAGCAGAAACCCTGG CCAGGCTCCCAGGCTCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGG GCCACTGGTATCCAGCCAGGTTGAGTGGCAGTGGGTCTG GGACAGATTCACCTCTACCATCAGCAGCTCCGAGTCTGAA GATTTTGCAGTGTATTACTGTGACGAGTCTCCGCCCTGGCC TAGGACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA	258
26521	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCC TGGGGCCCTCAAGTGAAGGTTTCTGCAAGGCATCTGGATACAC CTTCAAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGGCAGGCCCCCTGG GGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGATCATCCCTACTTT GGTACAGCAACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCA GATTACCCGGGACCAATCCAGGACACAGCTACATGGAGC TGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCGGTGTACTACTGC CTAGGTTGCCACTGGGATCCAGGCCCTACTACGGCATGGA TGATGGGGCCAGGGAACAAGTGTCACTCTCTCA	259	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTCCCTGTCTGCATC TGTAGGAGACAGAGTCACTCACTTCCCGCCAAAGTCAAG AGCATTAGCAGCTATTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGG GAAAGCCCTTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTGC AAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGG GACAGATTTCACTCTACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAG ATTTTGCAGTGTATTACTGTGACGAGTCTCCGCCCTGGCC CTACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA	260
29513	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCC TGGGGCCCTCAAGTGAAGGTTTCTGCAAGGCATCTGGATACAC CTTCCAGAACTATGCTATCAGCTGGGTGGCAGGCCCCCTGG GACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGTATCTGTGCTACTTTG GTACAGGAACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCA GTTACCCGGGACCAATCCAGGACACAGCTACATGGAGC GAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCGGTGTACTACTGG CTAGGTTGCCACTGGGACAGAAAGGCTACTACGGCATGGAT GTATGGGGCCAGGGAACAAGTGTCACTCTCTCA	261	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTCCCTGTCTGCATC TGTAGGAGACAGAGTCACTCACTTCCCGCCAAAGTCAAG AGCATTAGCAGCTATTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGG GAAAGCCCTTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTGC AAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGG GACAGATTTCACTCTACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAG ATTTTGCAGTGTATTACTGTGACGAGTCTCCGCCCTGGCC CTACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA	262
26493	GAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCC TGGCAGGCTCCCTGAGACTCTCTGTGAGGCTCTGGATTAC CTTTGGTGAATTGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGG GAAGGGCTTGGAGTGGGTCTCAGGTATTACTTGGAAATG GTAGCATAGGCTATGGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCCA TCTCCAGAGACACCCCAAGAACTCCCTGTACTGCAAAATGA ACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCGGTGTACTACTGCC AAGCCAGTGCACAAATCTAGAGGCCATAGAGTATGGGGTCA GGGTACAATGGTCACTCTCTCA	263	GACATCCAGTGGACCCAGTCTCCATCTCCCTGTCTGCATC TGTAGGAGACAGAGTCACTCACTTCCCGCCAAAGTCAAG GGTATTAGCAGCTGGTATGCTGGTATCAGCAGAAACCAGG GAAAGCCCTTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTGC AAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGG GACAGATTTCACTCTACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAG ATTTTGCAGTGTATTACTGTGACGAGTCTCCGCCCTGGCC CTACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA	264

Антитело	ДНК VH	SEQ ID NO:	ДНК VL	SEQ ID NO:
29520	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCC TGGCAGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCGGATTCA CTTTCCGGGATATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAG GGAAAGGGCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTACTTGGAAATG GGTTTGATAGGCTATCGGGACTGTGAAGGGCCGATTCA ATCTCCAGAGACAAGCCCAAGAACTCCCTGTATCGCAAATG AACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTACTACTGCGC CAAGCCAGTCCACGTTTGGAGGCTAGACGTATGGGCTC AGGGTACAATGGTCAACCTCTCTCA	265	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATC TGTAGGAGACAGAGTCAACATCACTTGTCCGGCCAGTCA GGTATTAGCAGCTGGTATGCTGTATCAGCAGAAACCAAG GAAAGCCCTTAAGCTCCTGATCTATGGTGCATCCAGTTTC AAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGGGCAGTGGATCTGG GACAGATTTCACTCTCACCATCAGGAGCTGCAGCCTGAAG ATTTTGCACCTTATTACTGTCAAGCAGGCACTTCACTCCCT GGACTTTTGGCGGAGGACCAAGGTTGAGATCAAA	266
29523	GAAGTCCAGCTGGTGGAACTGGGGAGGCTGGTCCAGCC TGGGAGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCGGATTCA CTTCCGGGACTATTATGCACTGGGTCCGGCAGGCTCCAG GCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGAGTATATGGCCTGATGGA AGTAATAAATCTATGACAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCA ATCTCCAGAGACAATCCCAAGAACAGGCTGTATCTGCAATG AACAGCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTACTACTGCGC CAAGCCAGTCCCAAACTTAGAGCCTGACGTATGGGCTCA GGTACAATGGTCAACCTCTCTCA	267	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATC TGTAGGAGACAGAGTCAACATCACTTGTCCGGCCAGTCA GGTATTAGCAGCTGGTATGCTGTATCAGCAGAAACCAAG GAAAGCCCTTAAGCTCCTGATCTATGGTGCATCCAGTTTC AAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGGGCAGTGGATCTGG GACAGATTTCACTCTCACCATCAGGAGCTGCAGCCTGAAG ATTTTGCACCTTATTACTGTCAAGCAGGCACTTCACTCCCT GGACTTTTGGCGGAGGACCAAGGTTGAGATCAAA	268
29527	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTCCAGC CTGGGAGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCGGATTCA CTTTCAGTAGCTTATATGCACTGGGTCCGGCAGGCTCCAG GCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGAGTATAGGTGGGATGGA AGTAATAAATCTATGACAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCA ATCTCCAGAGACAATCCCAAGAACAGGCTGTATCTGCAATG AACAGCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTACTACTGCGC CAAGCCAGTCCCAAGCTTAGAGCCTGACGTATGGGCTCA AGGTACAATGGTCAACCTCTCTCA	269	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATC TGTAGGAGACAGAGTCAACATCACTTGTCCGGCCAGTCA GGTATTAGCAGCTGGTATGCTGTATCAGCAGAAACCAAG GAAAGCCCTTAAGCTCCTGATCTATGGTGCATCCAGTTTC AAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGGGCAGTGGATCTGG GACAGATTTCACTCTCACCATCAGGAGCTGCAGCCTGAAG ATTTTGCACCTTATTACTGTCAAGCAGGCACTTCACTCCCT GGACTTTTGGCGGAGGACCAAGGTTGAGATCAAA	270
31288	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTGAAGCC TTCCGAGACCTGTCCCTCACCTGCATGTCTGTGGTCC CATCAGCAGTGGGAGTTACTACTTGGCGTGGATCCGGCAGC CCCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAGTATCTTCCG AGTGGAGCACCTACTACAACCCCTCCCTCGAGAGTCCAGT CACCATATCGGTAGACACCTCCAAAGAACAGTCTCCCTGAA GCTGAGTTCTGTGACCCGCGCAGACACGGCGGTACTACT CGCCATAGAAAGGAGTAACTTAAAGGACTTCGGATATGTAG CATTCGACATATGGGTCAGGCTACAACCTGACCGTCTCTCA	335	GAAATAGTATGACCGAGTCTCCAGCCACCTGTCTGTGTCT TCCAGGGAAAGAGCCACCTCTCCTGCAGGGCCAGTCA AGTGTAGCAGCAACTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGG CCAGCTCCAGGCTCCTCATCTATGATGTCATCCAGCCAG GCCACTGGTATCCAGCCAGGTTGAGTGGCAGTGGGCTG GGAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGGCACTGCAAGTCA GATTTGCACTTATTACTGTCAAGCAGTCCCGCCCTGGCC TAGGACTTTTGGCGGAGGACCAAGGTTGAGATCAAA	338
Антитело	ДНК VH	SEQ ID NO:	ДНК VL	SEQ ID NO:
32919	CAGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGCCAGGACTGGTGAAGCCT TGGGAGACCTGTCCCTCACCTGCATGTCTGTGGTCCCA TCAGCAGTGGGAGTTACTACTTGGCGTGGATCCGGCAGCCC CAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAGTATCTTCCGAGT GGAGCACCTACTACAACCCCTCCCTCGAGAGTCCAGTCA ATCGGTAGACACGTCGAAAGAACAGTCTCCCTGAAGCTGAGT TCTGTGACCCGCGCAGACACGGCGGTACTACTGCGCCATA GAAGGAGCTAACTTAAAGGACTTCGGATATGTAGCATTCGACAT ATGGGTCAGGGTACAACCTGTCACCGTCTCTCA	337	GAAATGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCTGTCTTTGTCTC CAGGGGAAAGAGCCACCTCTCCTGCAGGGCCAGTCA GAGTGTAGCAGTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAG GCTCCAGGCTCCTCATCTATGATGTCATCCAGCCAGGCT GGCATCCAGCCAGGTTGAGTGGCAGTGGGCTCGGGACAGA CTTCACTCTCACCATCAGCAGGCACTGCAAGTATTGTC AGTTTATTACTGTCAAGCAGGAAACCCAGGCTAGGACTTT TGGCGGAGGACCAAGGTTGAGATCAAA	338
32931	CAGTGCAGCTGCAGGAGTCCGGCCAGGACTGGTGAAGCCT TGGGAGACCTGTCCCTCACCTGCATGTCTGTGGTCCCA TCAGCAGTGGGAGTTACTACTTGGCGTGGATCCGGCAGCCC CAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAGTATCTTCCGAGT GGAGCACCTACTACAACCCCTCCCTCGAGAGTCCAGTCA ATCGGTAGACACGTCGAAAGAACAGTCTCCCTGAAGCTGAGT TCTGTGACCCGCGCAGACACGGCGGTACTACTGCGCCATA GAAGGAGCTAACTTAAAGGACTTCGGATATGTAGCATTCGACAT ATGGGTCAGGGTACAACCTGTCACCGTCTCTCA	339	GAAATAGTATGACCGAGTCTCCAGCCACCTGTCTGTGTCT CCAGGGAAAGAGCCACCTCTCCTGCAGGGCCAGTCA GAGTGTAGCAGCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAG GGCTCCAGGCTCCTCATCTATGATGTCATCCAGCCAGGCT CGGTATCCAGCCAGGTTGAGTGGCAGTGGGCTCGGGACAG AGTTCACCTCAACATCAGCAGGCTGCAAGTATTGTC CAGTTTATTACTGTCAAGCAGTCCCGCCCTGACGACTTT TGGCGGAGGACCAAGGTTGAGATCAAA	340
26432	CAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGTGAAGTGAAGAACCT GGGTCTCCGTAAGGTCTCTGCAAGGCTTCTGGAGGCC TTCAGCAGTACTCATAGCTGGTGGCAGGCCCCCTGGA CAAGGGCTTGAAGTGGAGGGATCACTCCATCTTTGGTA CAGCAAATACGCACAGAAAGTTCCAGGGCAGAGTCAAGATTAC CGCGGAGAAATCCACGAGCAGCCCTACATGGAGCTGAGCAG CCTGAGATCTGAGGACACGGCGGTACTACTGCGCCAGAGA GGCTCAATCTACAGGCTTCCATTCGACATATGGGTCAGGGT ACAATGGTCAACCTCTCTCA	341	GAAATAGTATGACCGAGTCTCCAGCCACCTGTCTGTGTCT CCAGGGAAAGAGCCACCTCTCCTGCAGGGCCAGTCA GAGTGTAGCAGCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAG GGCTCCAGGCTCCTCATCTATGATGTCATCCAGCCAGGCT CTGGTATCCAGCCAGGTTGAGTGGCAGTGGGCTCGGGACAG GAGTTCACCTCAACATCAGCAGGCTGCAAGTATTGTC CAGTTTATTACTGTCAAGCAGTCCCGCCCTGACGACTTT CTTTTGGCGGAGGACCAAGGTTGAGATCAAA	342
32959	CAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGTGAAGTGAAGAACCT GGGTCTCCGTAAGGTCTCTGCAAGGCTTCTGGAGGCC TTCAGCAGTACTCATAGCTGGTGGCAGGCCCCCTGGA CAAGGGCTTGAAGTGGAGGGATCACTCCATCTTTGGTA CAGCAAATACGCACAGAAAGTTCCAGGGCAGAGTCAAGATTAC CGCGGAGAAATCCACGAGCAGCCCTACATGGAGCTGAGCAG CCTGAGATCTGAGGACACGGCGGTACTACTGCGCCAGAGA GGCTCAATCTACAGGCTTCCATTCGACATATGGGTCAGGGT ACAATGGTCAACCTCTCTCA	369	GAAATAGTATGACCGAGTCTCCAGCCACCTGTCTGTGTCT CCAGGGAAAGAGCCACCTCTCCTGCAGGGCCAGTCA GAGTGTAGCAGCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAG GGCTCCAGGCTCCTCATCTATGATGTCATCCAGCCAGGCT CTGGTATCCAGCCAGGTTGAGTGGCAGTGGGCTCGGGACAG GAGTTCACCTCAACATCAGCAGGCTGCAAGTATTGTC CAGTTTATTACTGTCAAGCAGTCCCGCCCTGACGACTTT CTTTTGGCGGAGGACCAAGGTTGAGATCAAA	370

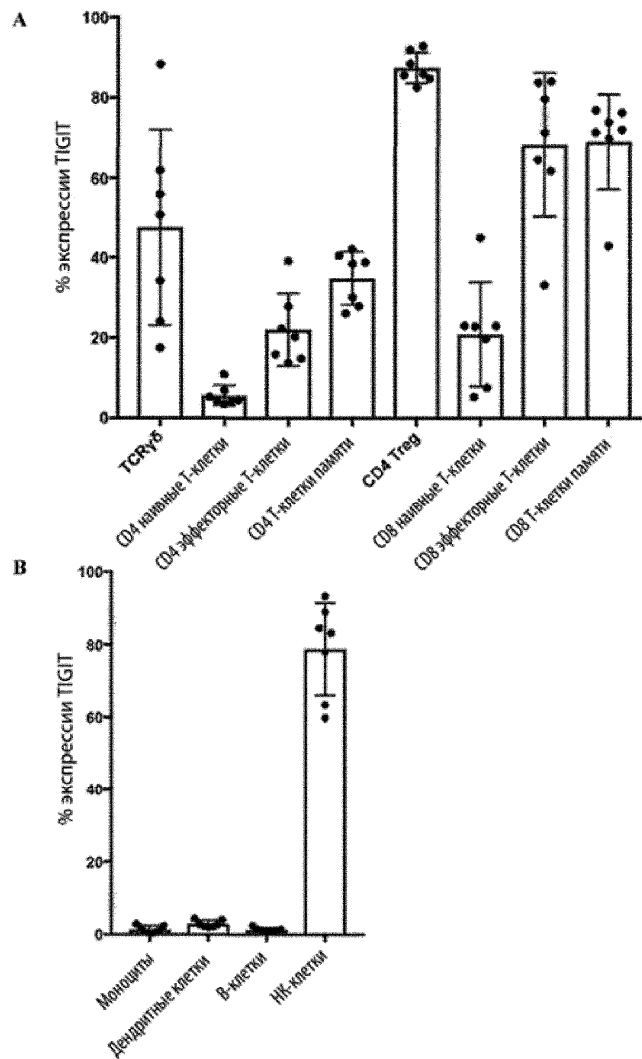
Фиг. 6

Конкуренция с лигандом CD155 человека



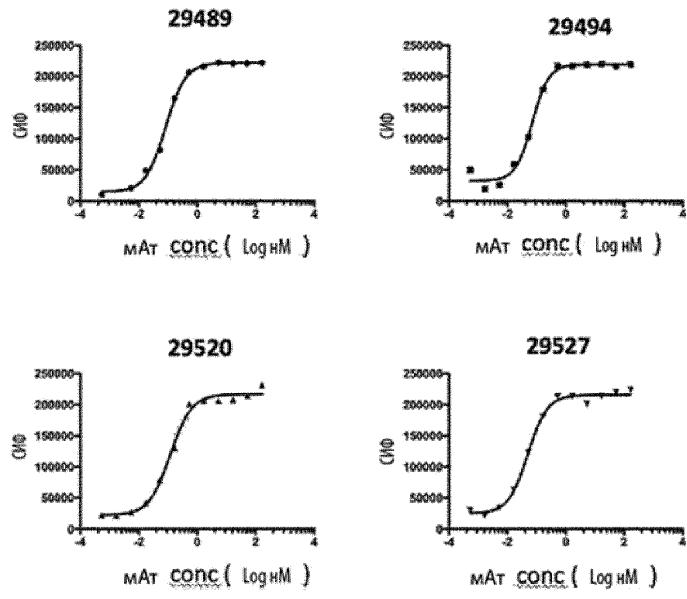
Фиг. 7

Экспрессия TIGIT на разных иммунных популяциях от МПК здоровых доноров



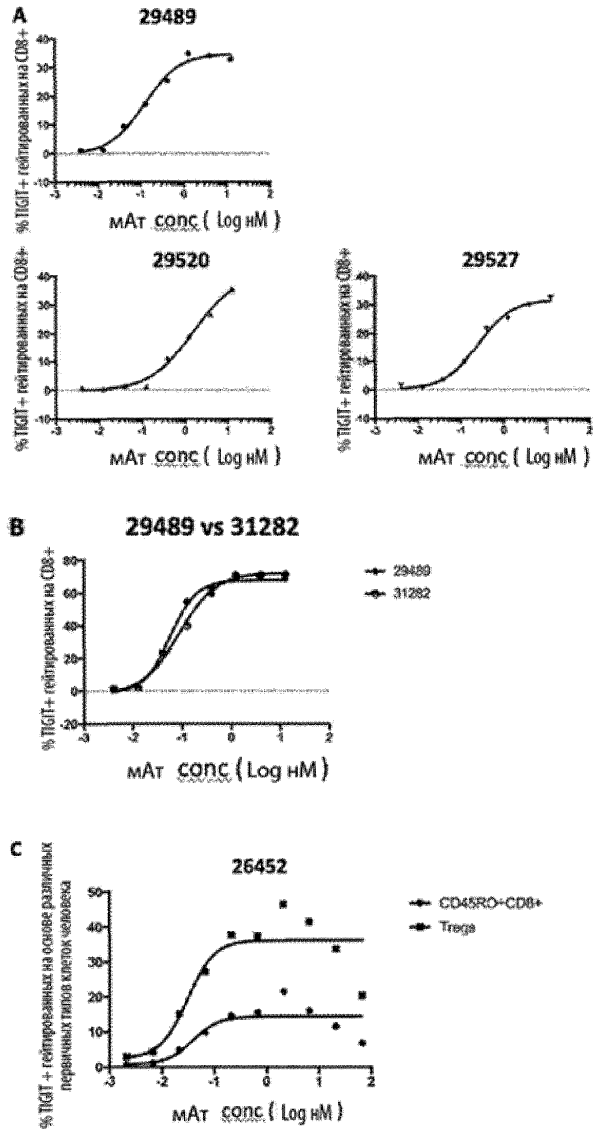
Фиг. 8

Связывание с Jurkat-hTIGIT



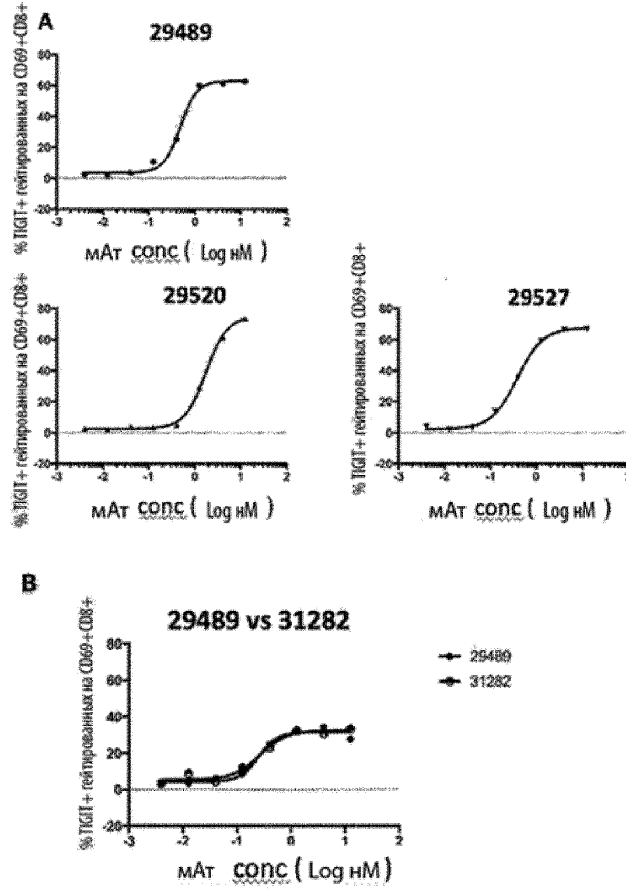
Фиг. 9

Связывание с первичными CD8⁺ T-клетками человека



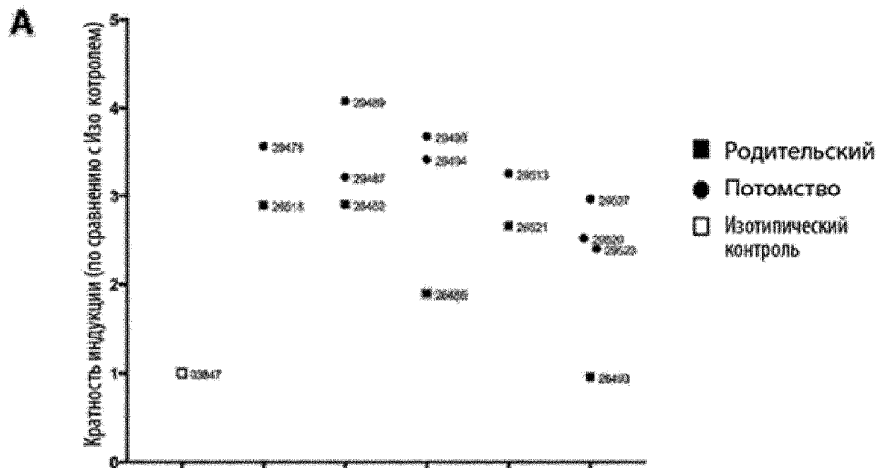
Фиг. 10

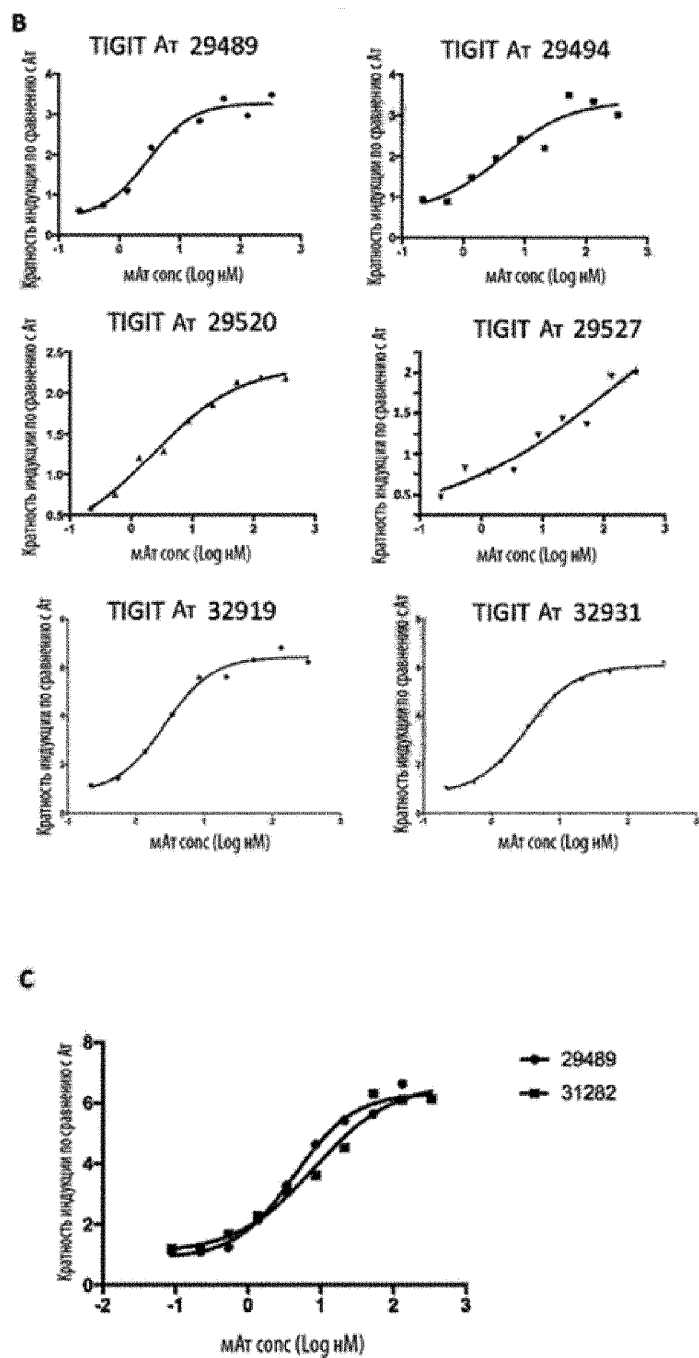
Связывание с первичными CD8+ Т-клетками Synomolgus



Фиг. 11

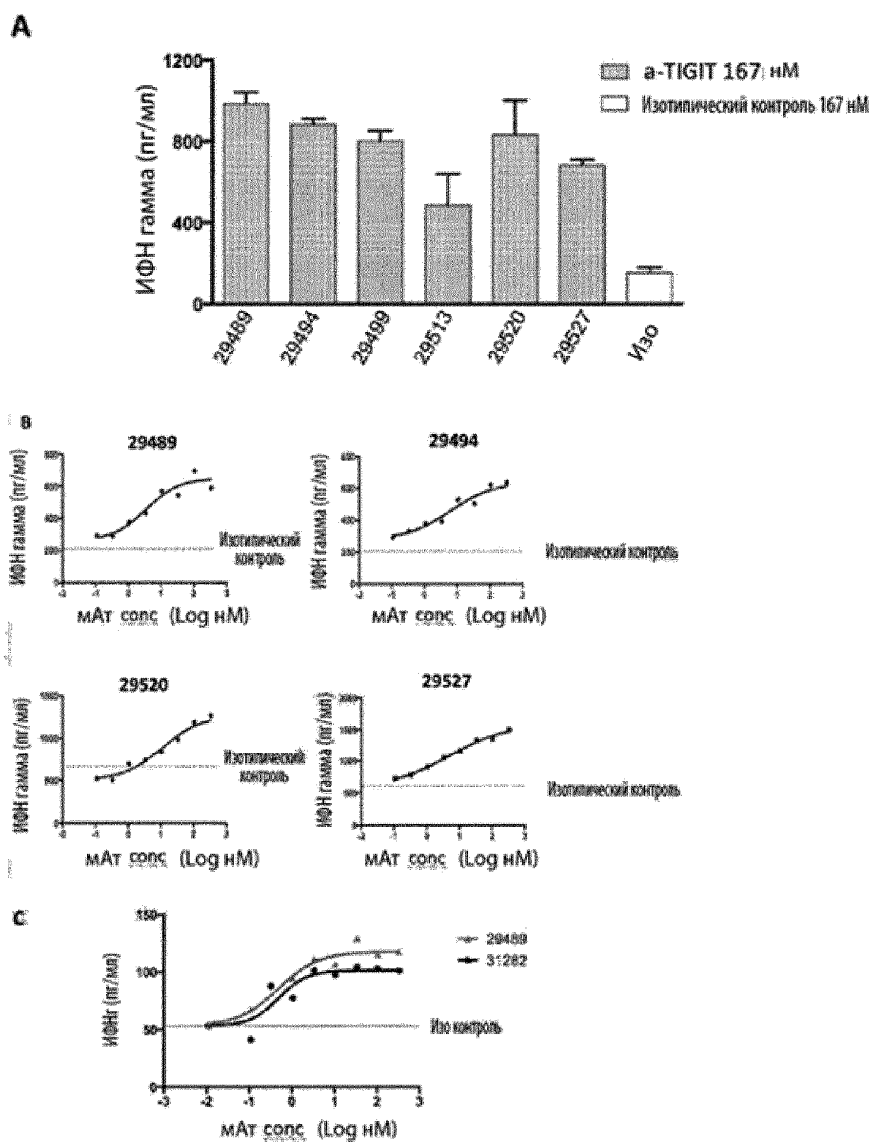
Эффект анти-TIGIT антител в биоанализе CHO-TCR-CD155 и Jurkat-hTIGIT





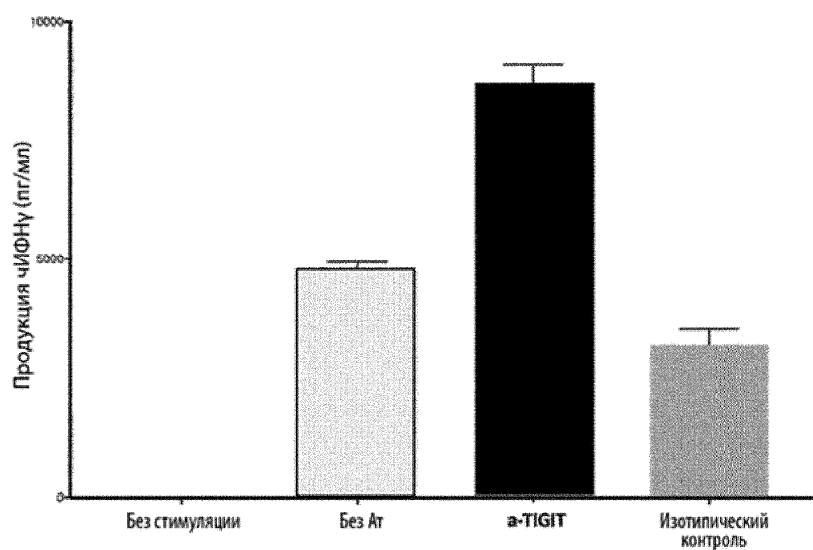
Фиг. 12

Эффект анти-TIGIT антител в функциональном анализе CD8+ T-клеток человека



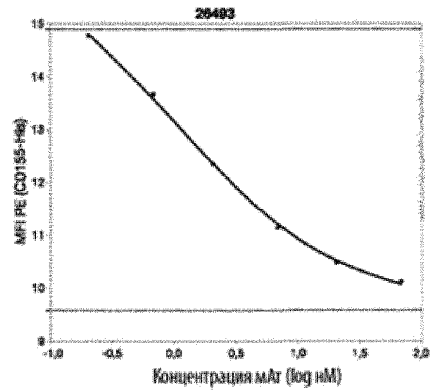
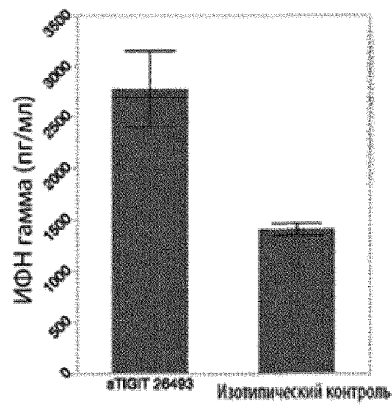
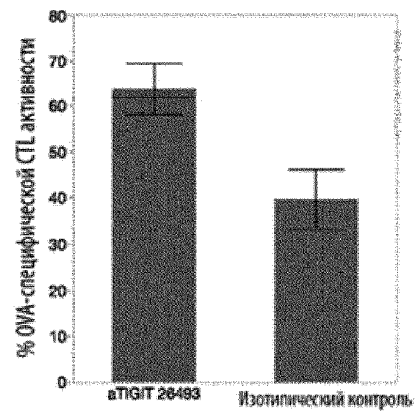
Фиг. 13

Эффект анти-TIGIT антител в функциональном анализе на основе TIL человека



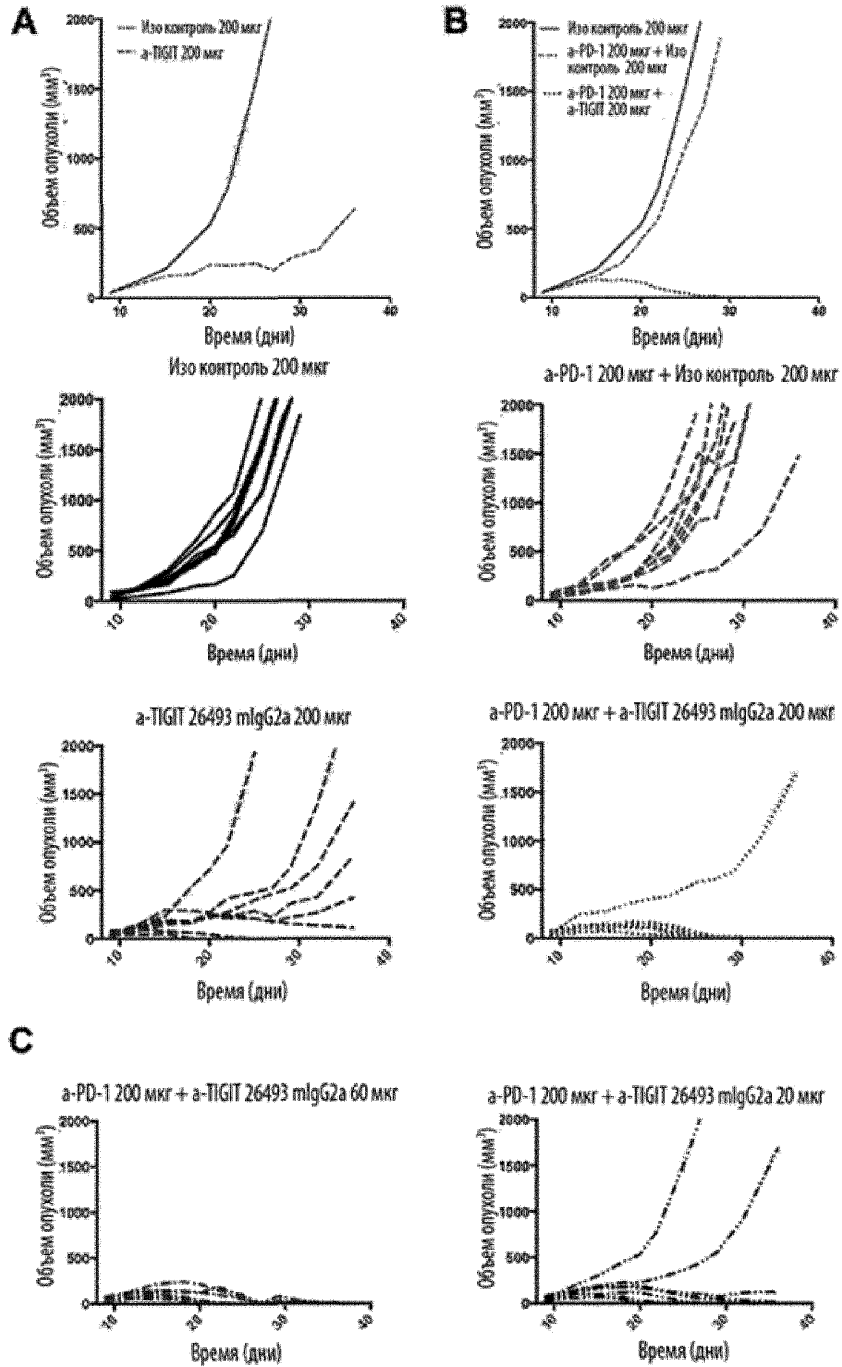
Фиг. 14

Характеризация суррогатного анти-ТГГТ антитела мыши, которое демонстрирует функциональную активность у мыши

A**B****C**

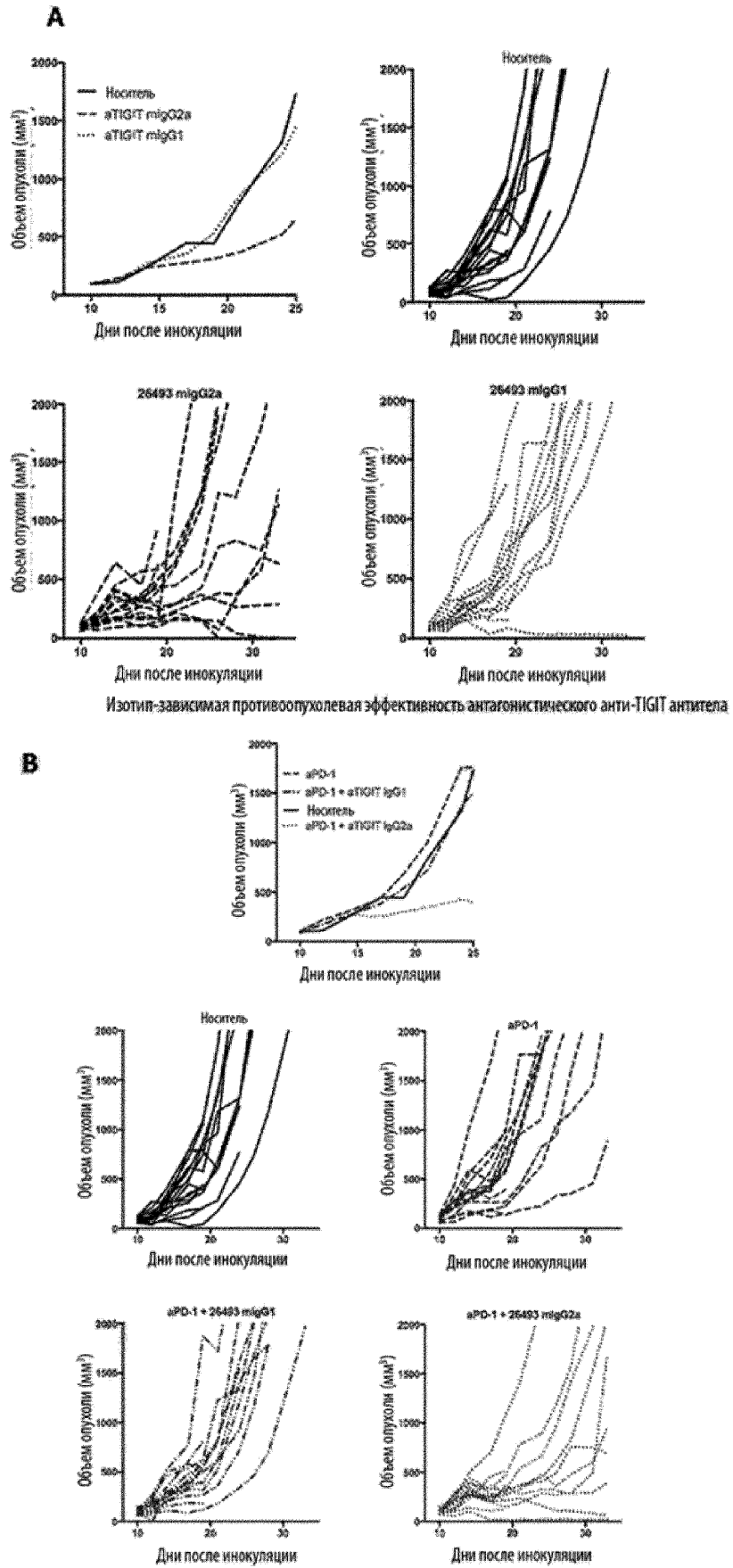
Фиг. 15

Противоопухолевая эффективность антагонистического анти-TIGIT антитела



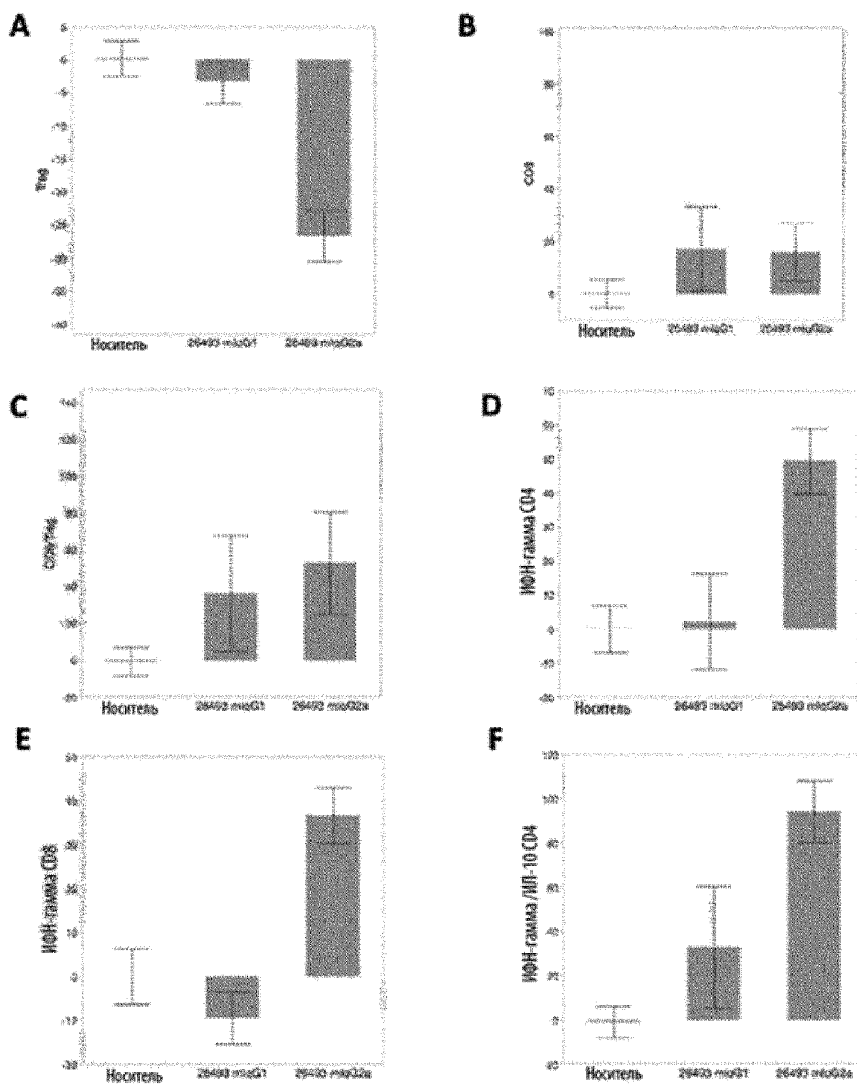
Фиг. 16

Изотип-зависимая противоопухолевая эффективность антагонистического анти-TIGIT антитела

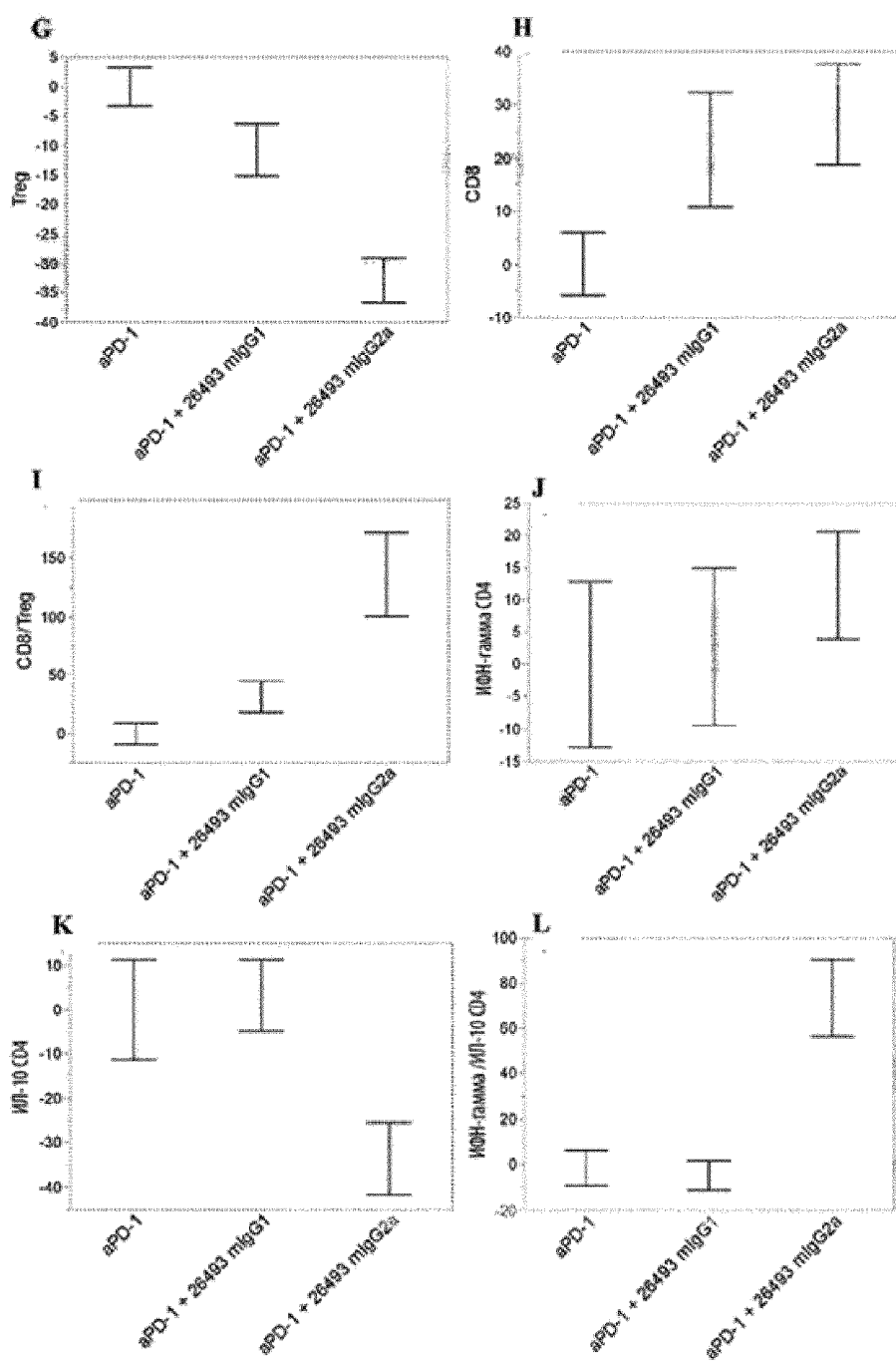


Фиг. 17

Механизм противоопухолевой эффективности антагонистического анти-TIGIT антитела

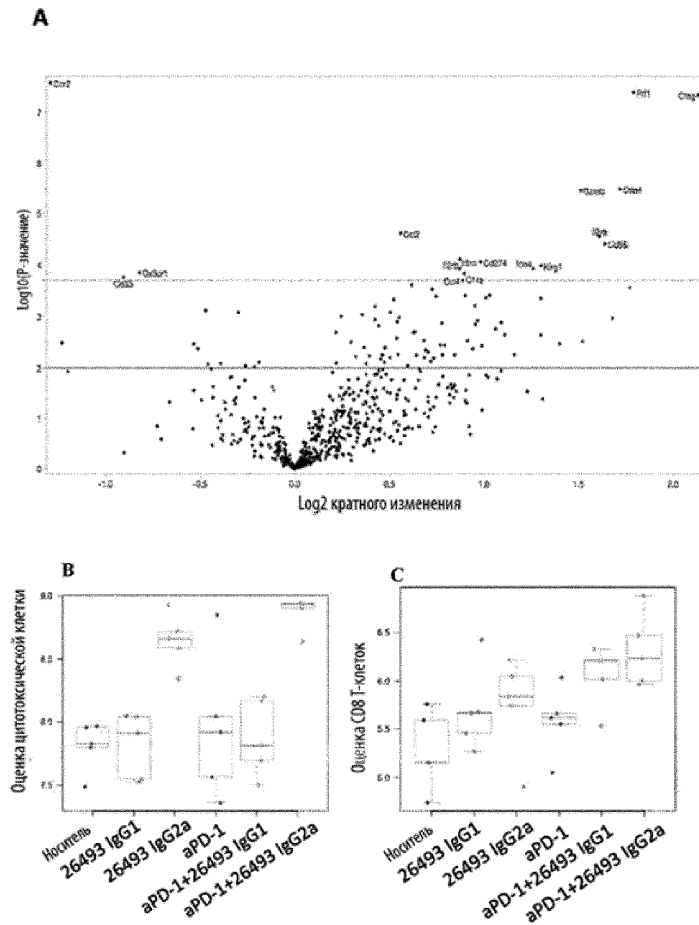


Механизм противоопухолевой эффективности антагонистического анти-TIGIT антитела



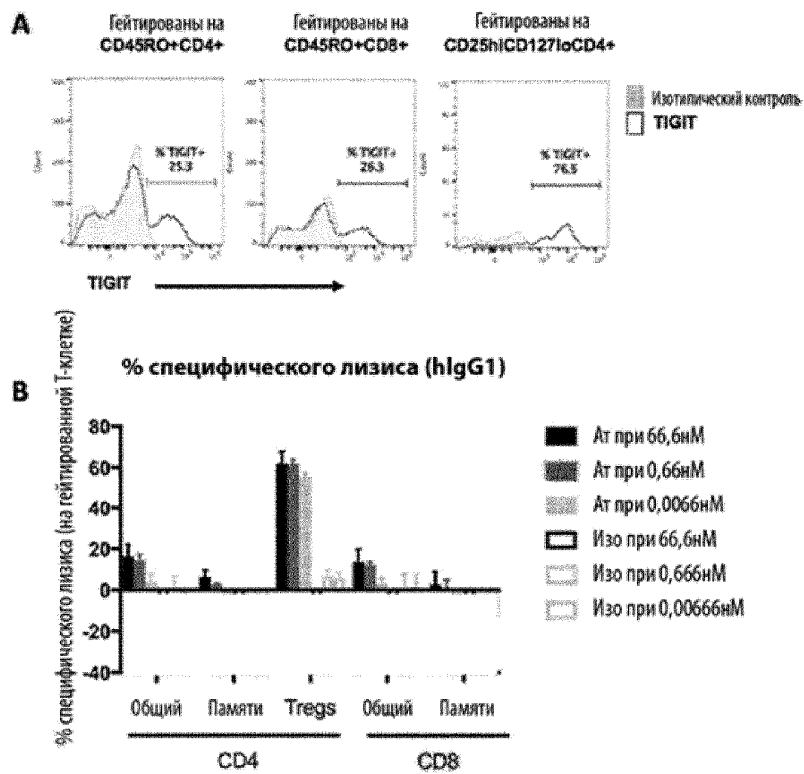
Фиг. 18

Механизм противоопухолевой эффективности антагонистического анти-TIGIT антитела
(транскрипционный анализ)



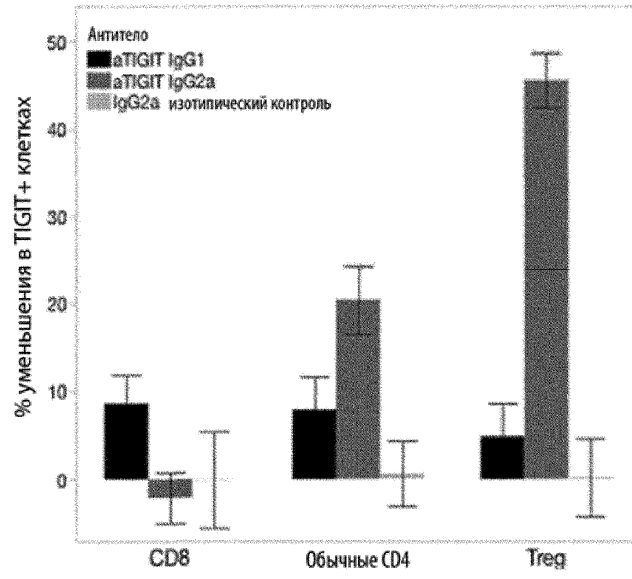
Фиг. 19

Активность АЗКЦ на МКПК здорового человека

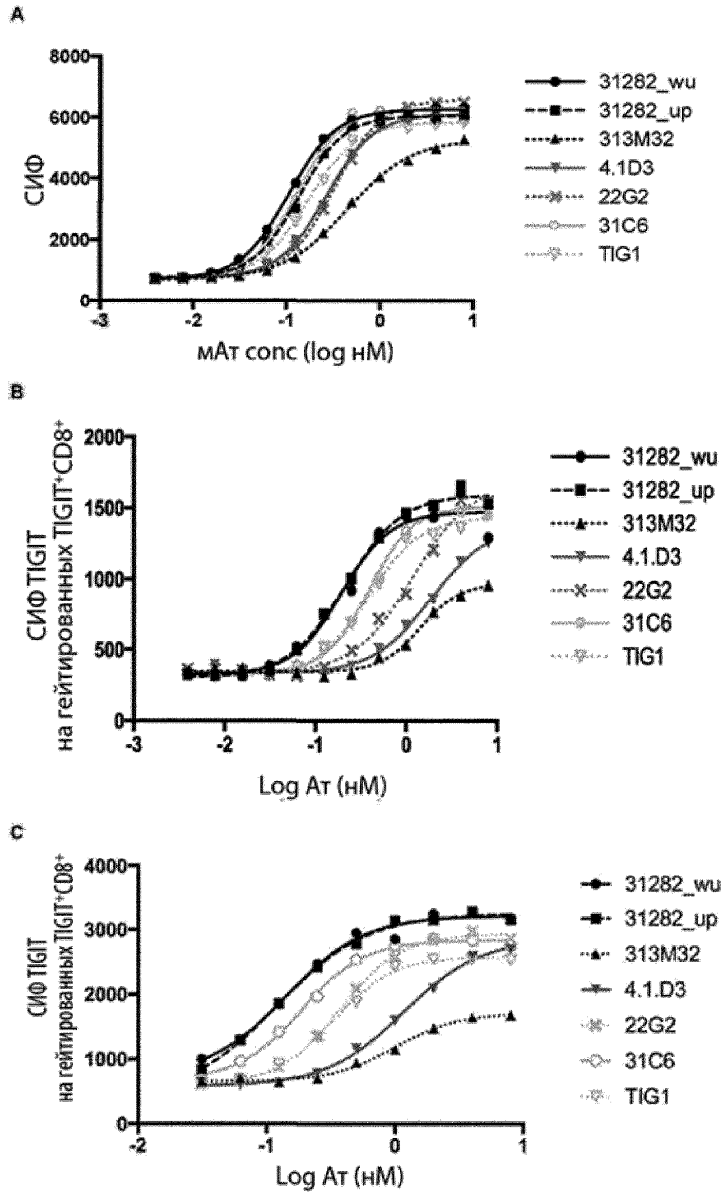


Фиг. 20

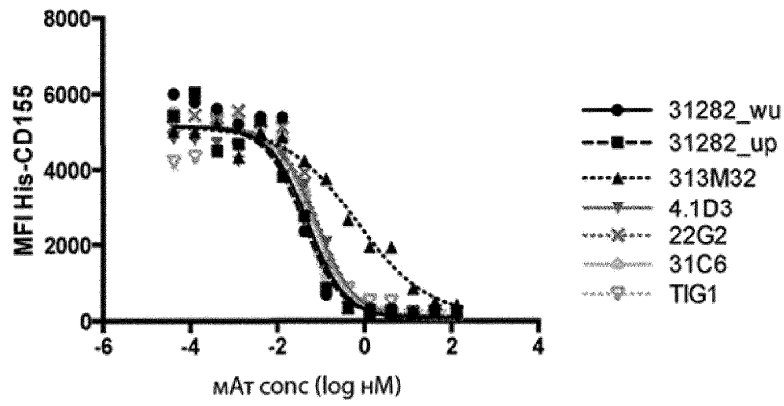
Преимущественное истощение Treg клеток в суспензии опухоли мыши



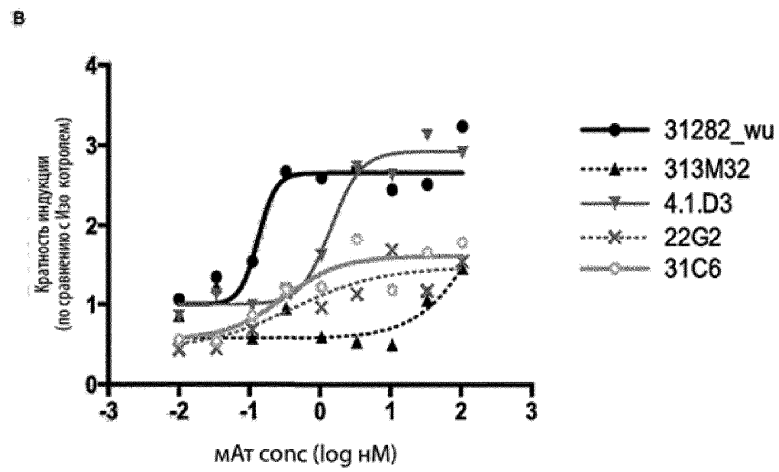
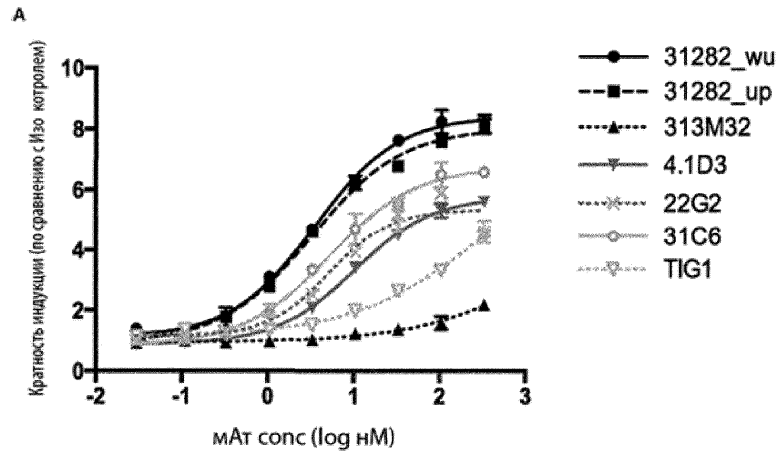
Фиг. 21



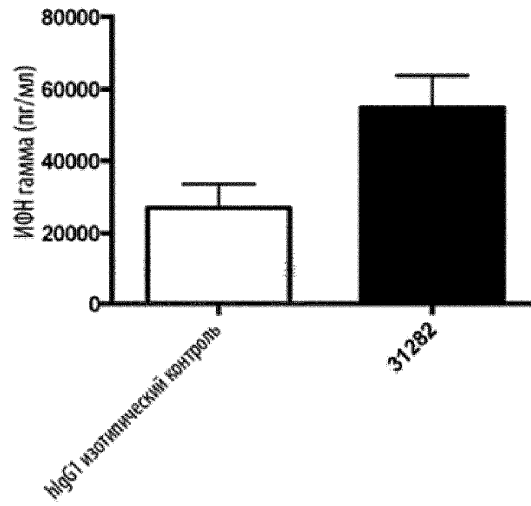
Фиг. 22



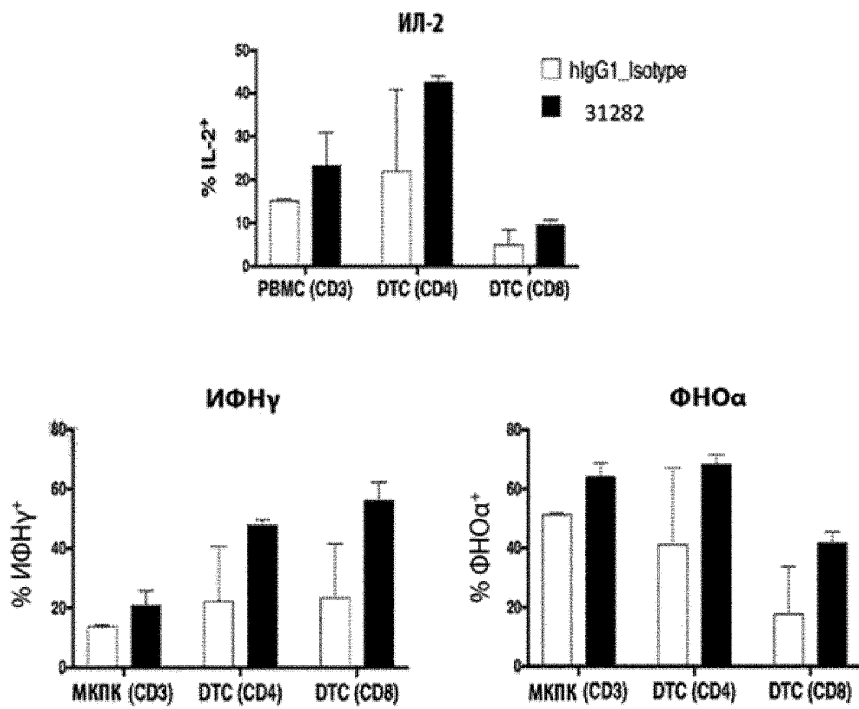
Фиг. 23



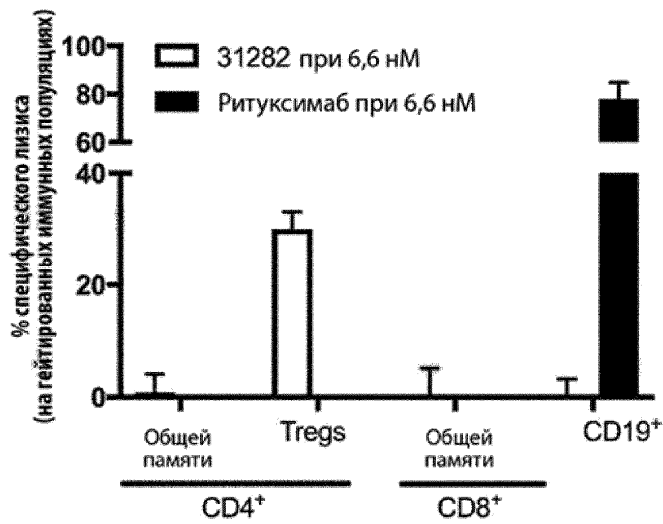
с



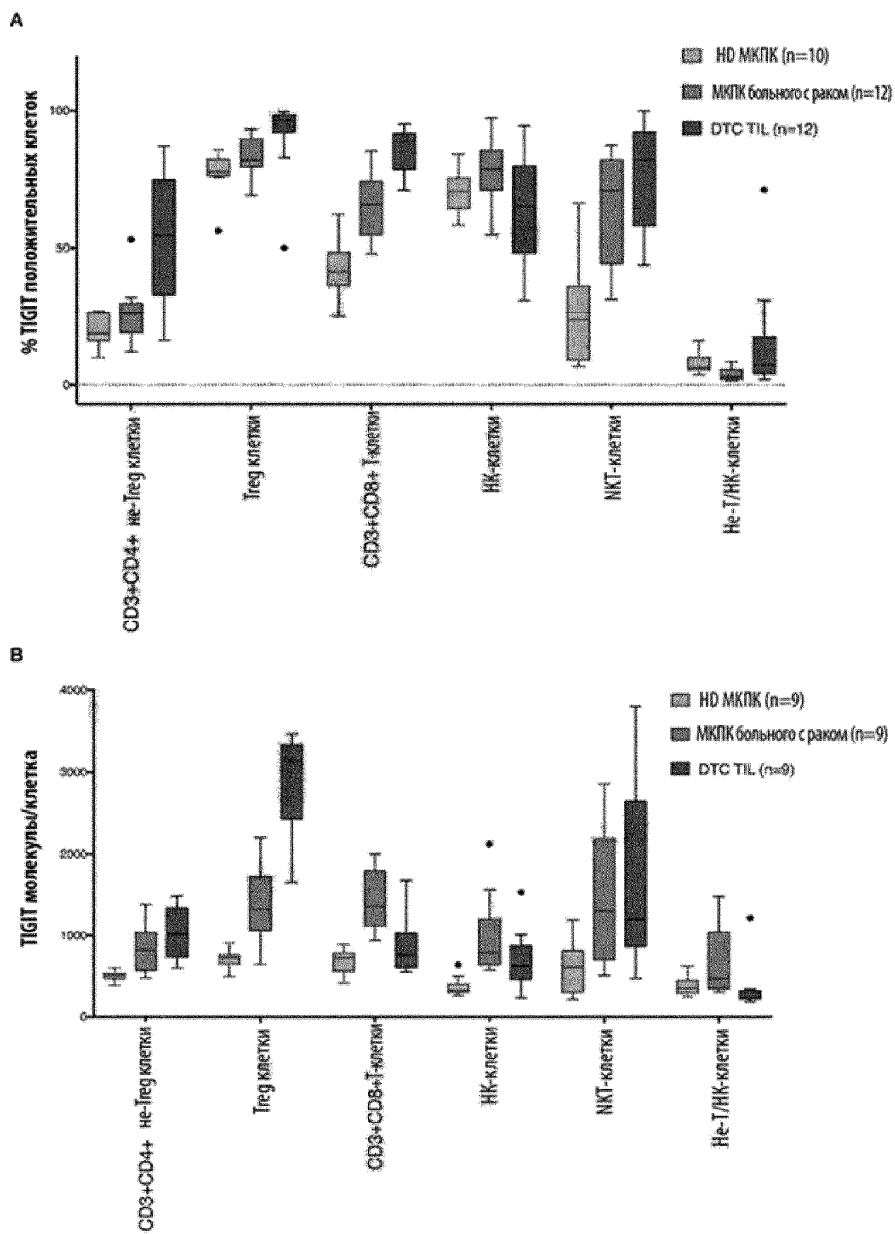
д



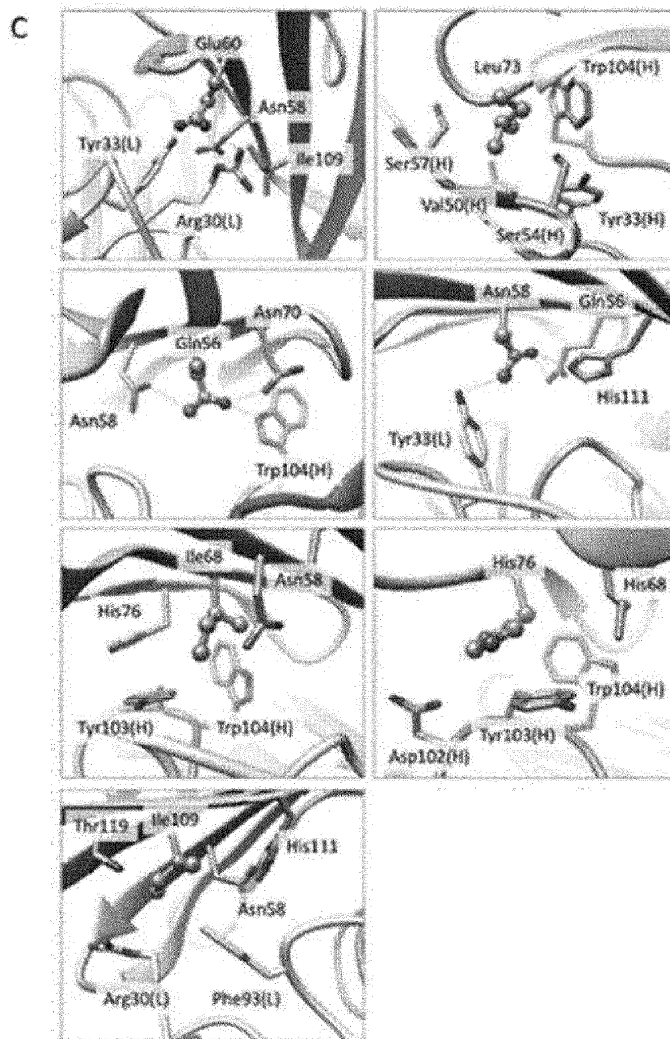
Фиг. 24



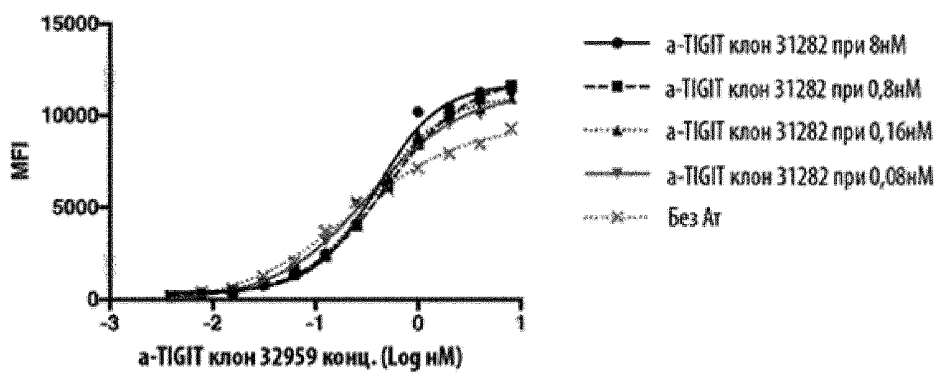
Фиг. 25



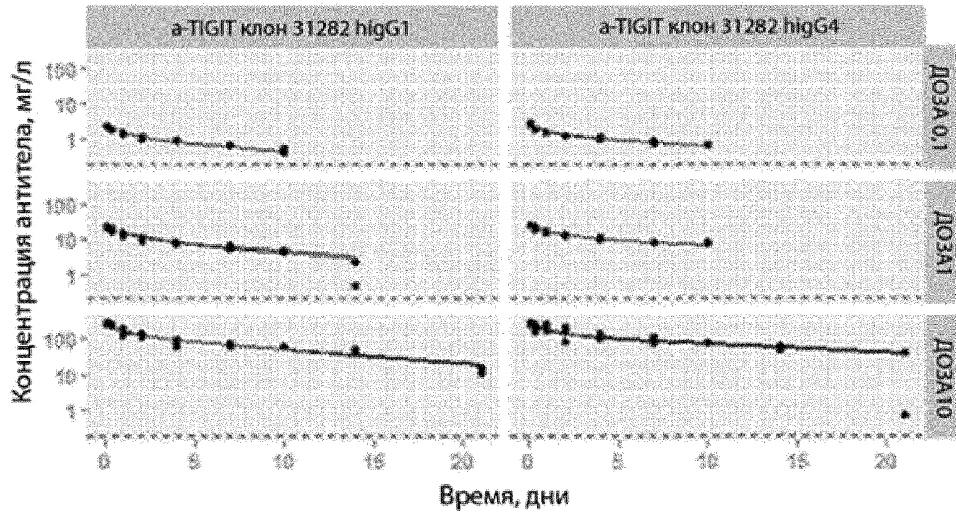
Фиг. 26



Фиг. 27

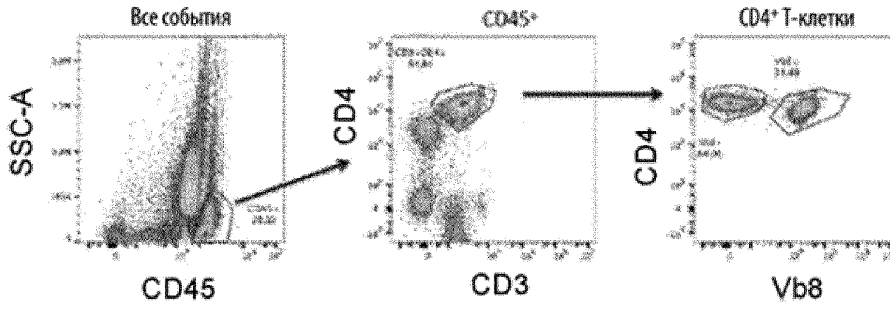


Фиг. 28

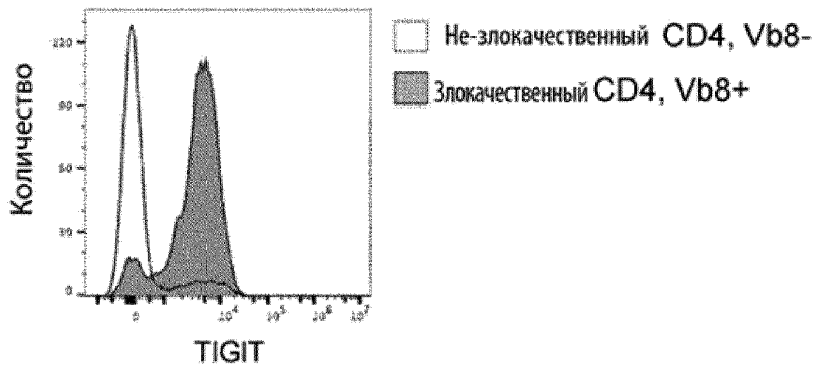


Фиг. 29

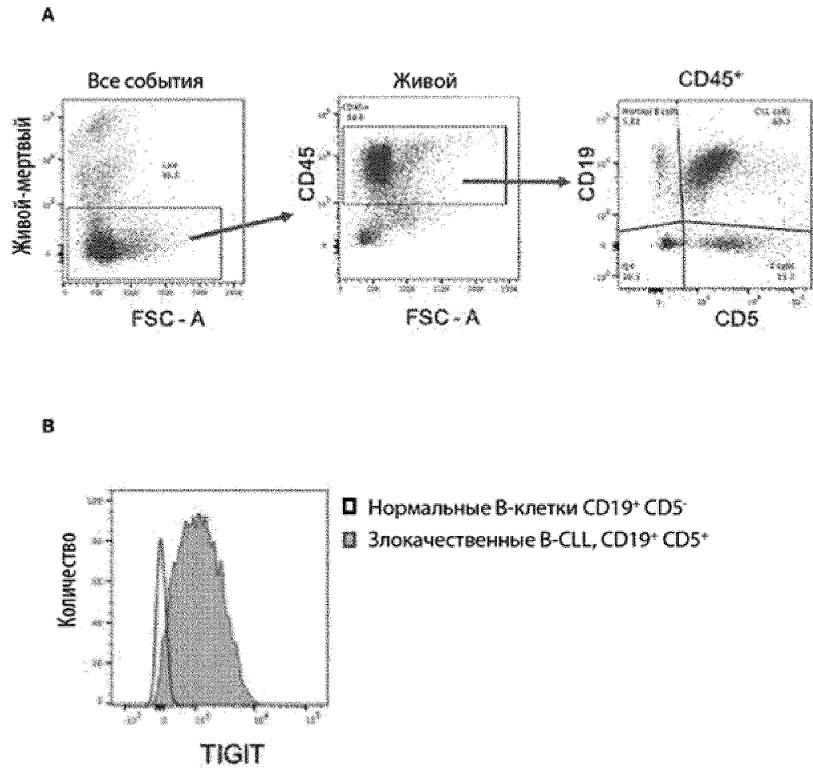
A



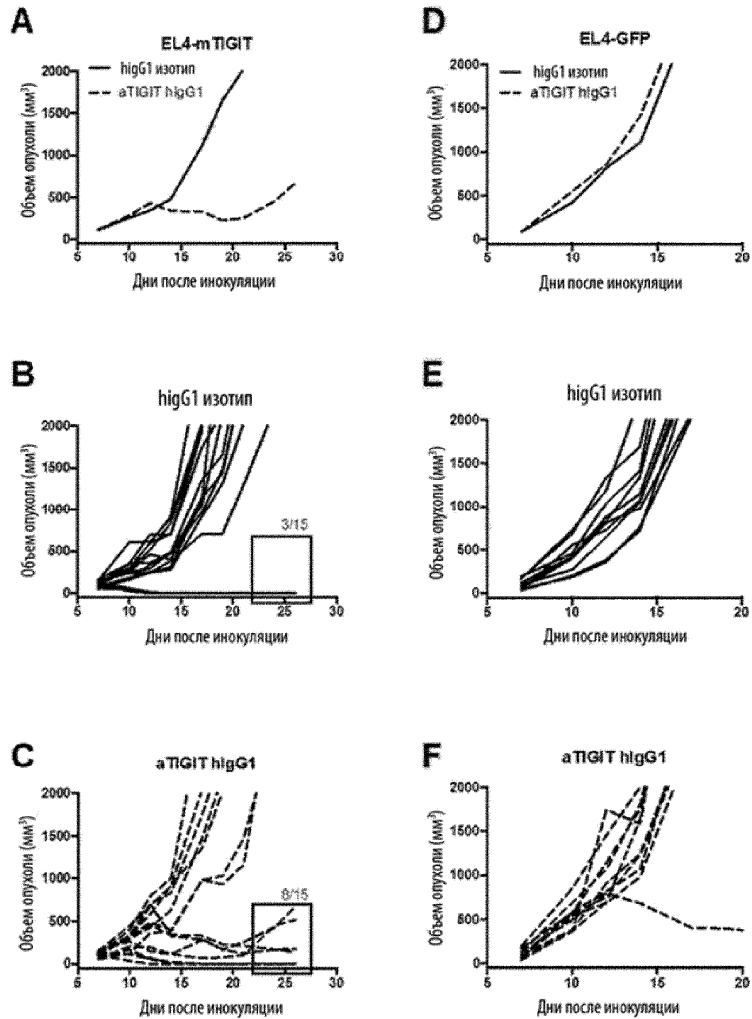
B



Фиг. 30

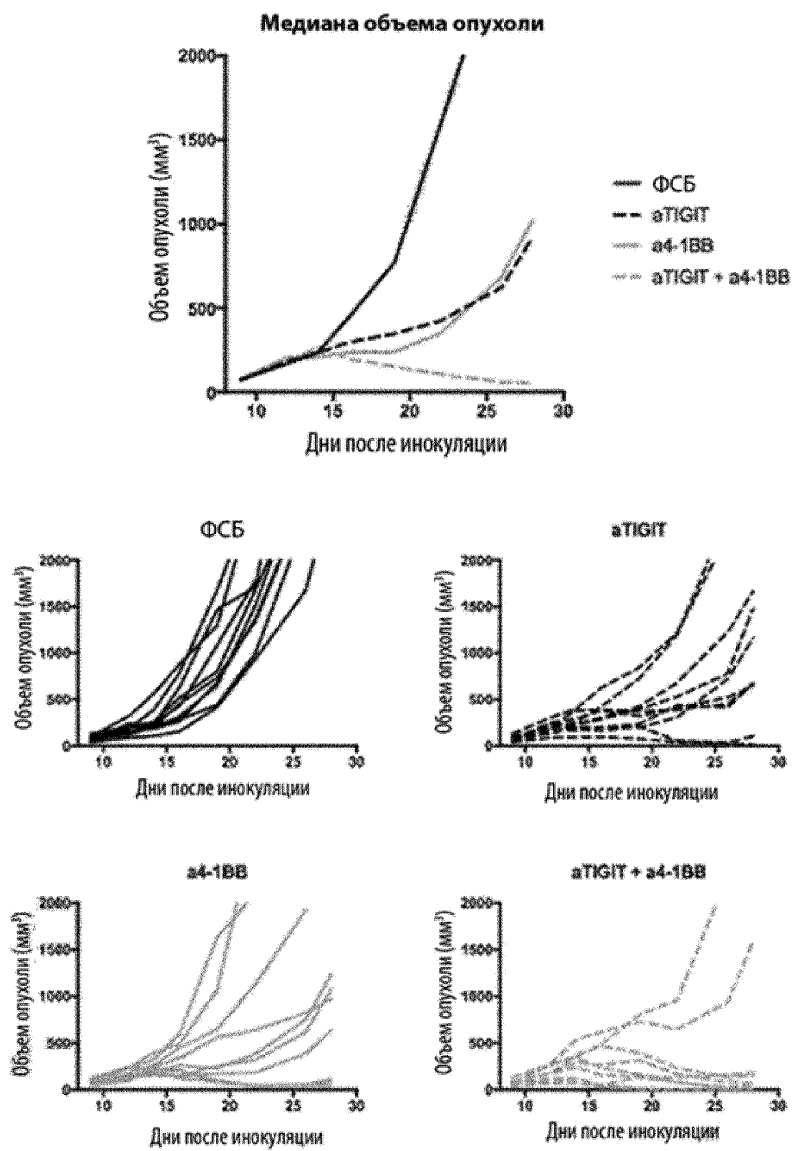


Фиг. 31

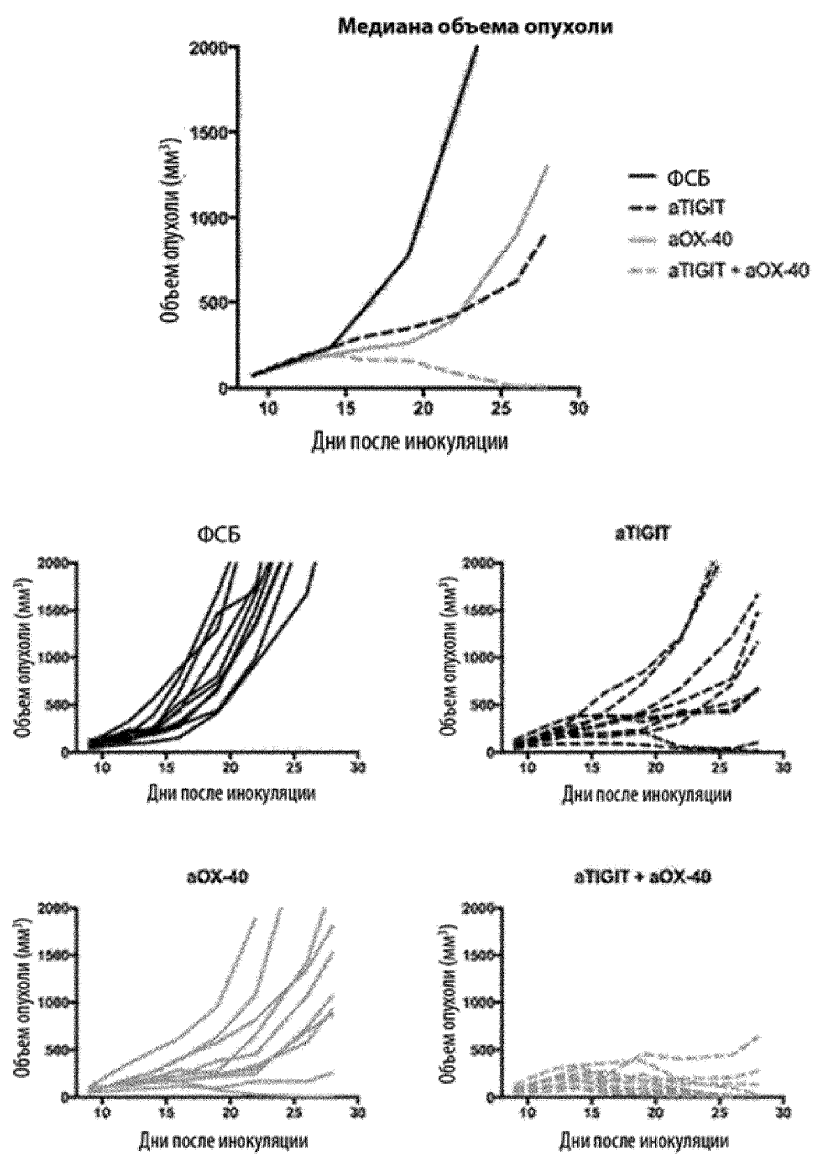


Фиг. 32

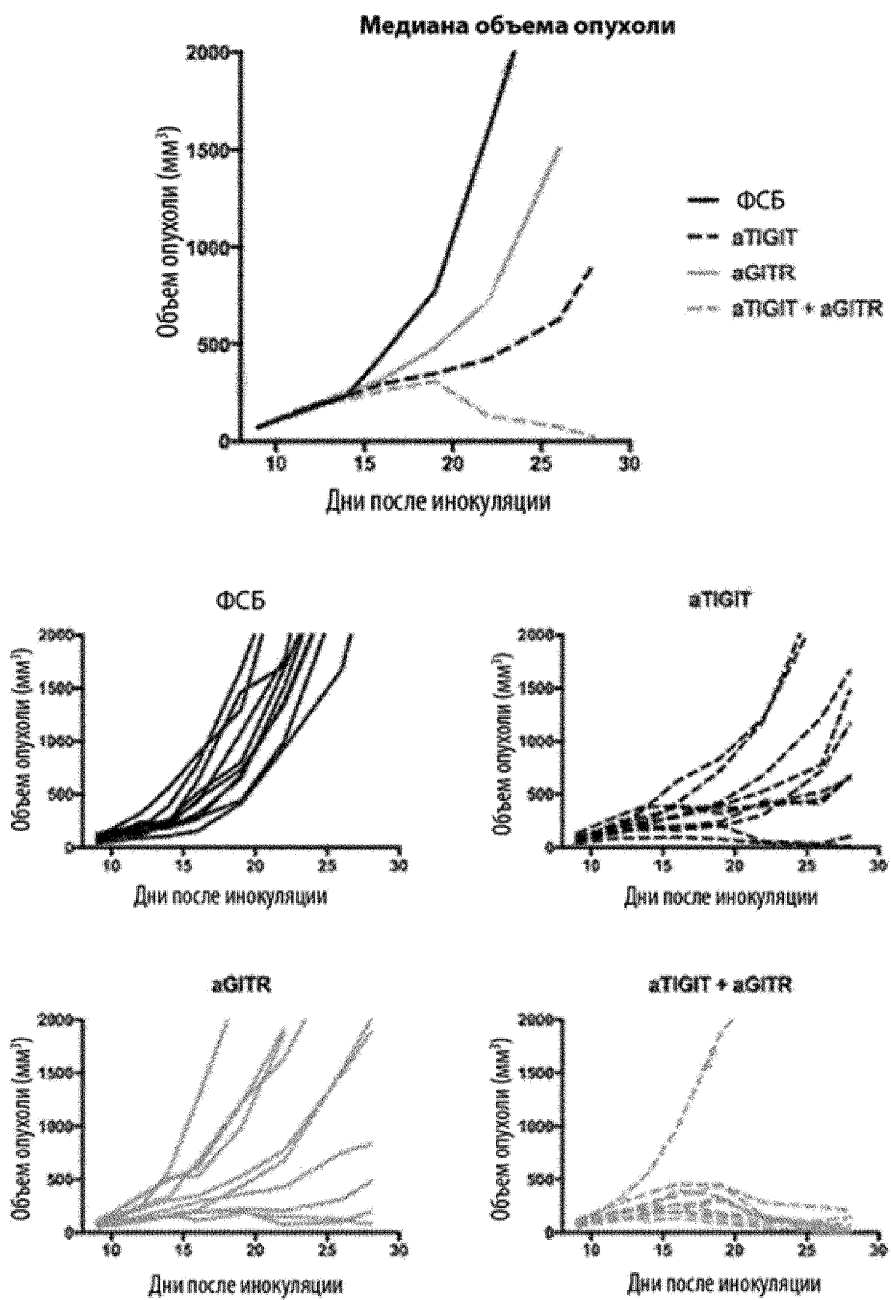
A



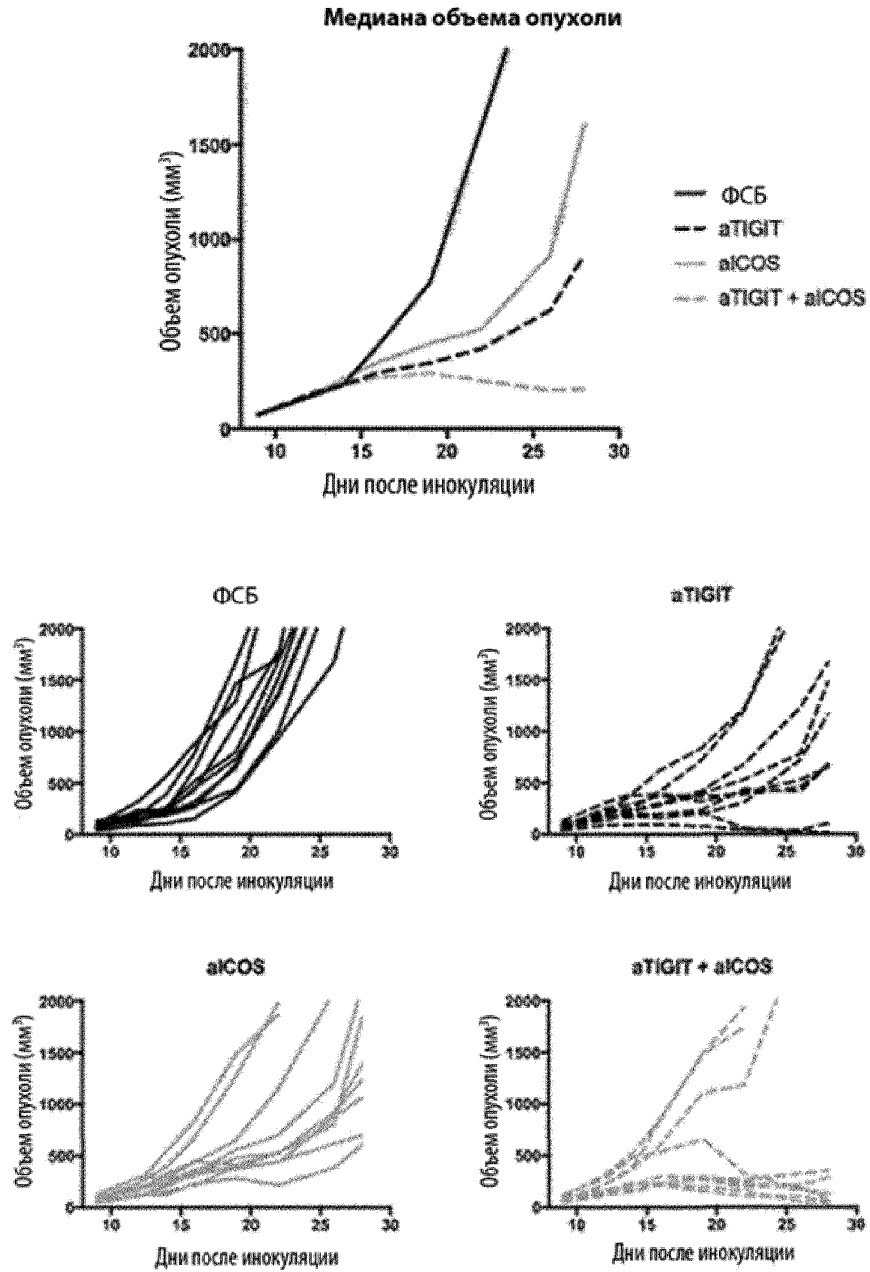
В



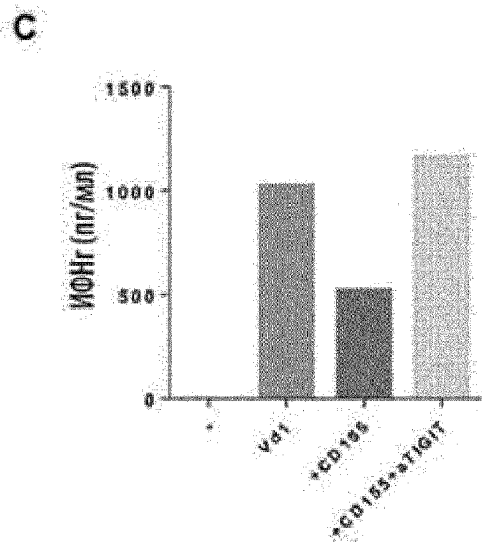
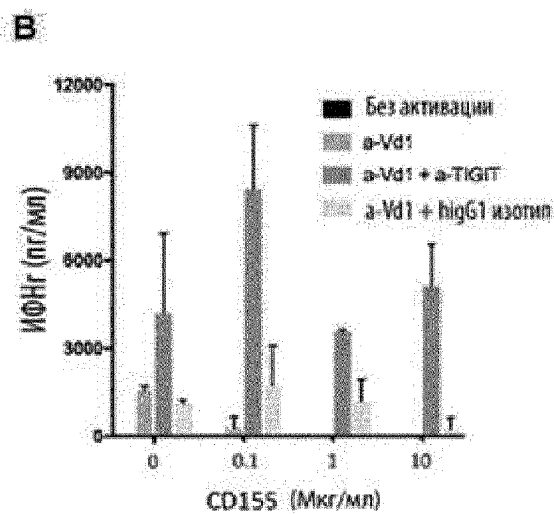
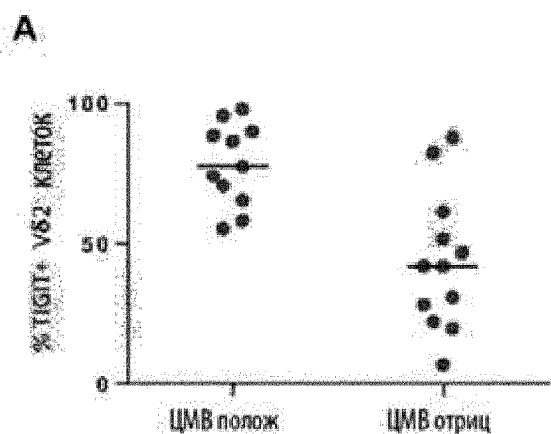
С



D



Фиг. 33



Фиг. 34