

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202390805** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2023.09.29**

(22) Дата подачи заявки  
**2018.02.28**

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)  
*C07K 16/46* (2006.01)  
*C07K 19/00* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

---

(54) **АНТИТЕЛА К TIGIT**

(31) **62/464,529; 62/616,779**

(32) **2017.02.28; 2018.01.12**

(33) **US**

(62) **201992039; 2018.02.28**

(71) Заявитель:  
**СИДЖЕН ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:

**Пясецки Джулия К., Бирз Кортни,  
Питерсон Скотт, Принц Бьянка (US)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

---

(57) Предложены изолированные антитела или антигенсвязывающие части, которые связываются с TIGIT человека (Т-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и ITIM). В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть имеет аффинность связывания (KD) с TIGIT человека менее чем 5 нМ. В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT блокирует связывание CD155 и/или CD112 с TIGIT.

**202390805**  
**A1**

**202390805**

**A1**

**АНТИТЕЛА К TIGIT**

## УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/464529, поданной 28 февраля 2017 г., и по предварительной заявке на патент США № 62/616779, поданной 12 января 2018 г., полное содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

## УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] TIGIT («Т-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и ITIM») представляет собой иммунный рецептор, который экспрессируется на поверхности подгрупп Т-клеток, например, активированных Т-клеток, Т-клеток памяти и Т-регуляторных клеток, и на поверхности естественных клеток-киллеров (NK). TIGIT является членом семейства CD28 в суперсемействе Ig белков и служит в качестве коингибирующей молекулы, которая ограничивает пролиферацию и активацию Т-клеток и функцию NK-клеток. TIGIT опосредует свой иммуносупрессивный эффект, конкурируя с CD226 (также известный как DNAX-вспомогательная молекула-1 или «DNAM-1») за тот же набор лигандов: CD155 (также известный как рецептор полиовируса или «PVR») и CD112 (также известный как относящийся к полиовирусу рецептор 2 или «PVRL2»). См., Levin et al., *Eur. J. Immunol.*, 2011, 41:902-915. Поскольку аффинность CD155 к TIGIT выше, чем его аффинность к CD226, в присутствии TIGIT передача сигнала CD226 ингибируется, тем самым ограничивая пролиферацию и активацию Т-клеток.

[0003] У пациентов с меланомой, экспрессия TIGIT повышалась на специфических к опухолевому антигену (ТА-специфических) CD8<sup>+</sup> Т-клетках и на CD8<sup>+</sup> инфильтрующих опухоль лимфоцитах (TIL). Блокировка TIGIT в присутствии экспрессирующих лиганд TIGIT (CD155) клеток увеличивала пролиферацию, выработку цитокинов и дегрануляцию как ТА-специфических CD8<sup>+</sup> Т-клеток, так и CD8<sup>+</sup> TILs. См., Chauvin et al., *J Clin Invest.*, 2015, 125:2046-2058. Таким образом, TIGIT представляет собой потенциальную терапевтическую мишень для стимуляции противоопухолевых Т-клеточных ответов у пациентов, хотя остается потребность в улучшенных способах блокирования TIGIT и стимулирования противоопухолевых ответов.

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] В одном из аспектов предлагаются изолированные антитела или их антигенсвязывающие части, которые связываются с

TIGIT человека (Т-клеточным иммунорецептором с Ig и ITIM доменами). В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть имеют аффинность связывания ( $K_D$ ) с TIGIT человека менее чем 5 нМ. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть имеют  $K_D$  для TIGIT человека менее чем 1 нМ. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть имеют  $K_D$  для TIGIT человека менее чем 100 пМ.

[0005] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть проявляют перекрестную реактивность с TIGIT яванского макака и/или TIGIT мыши. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть проявляют перекрестную реактивность как с TIGIT яванского макака, так и с TIGIT мыши.

[0006] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть блокируют связывание CD155 с TIGIT. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть блокируют связывание CD112 с TIGIT. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть блокируют связывание как CD155, так и CD112 с TIGIT.

[0007] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть связываются с эпитопом TIGIT человека, который содержит аминокислотные положения 81 и 82. В некоторых вариантах осуществления эпитоп содержит Phe в положении 81 и/или Lys, или Ser в положении 82. В некоторых вариантах осуществления эпитоп содержит Phe81 и Lys82.

[0008] В некоторых вариантах осуществления эпитоп представляет собой прерывистый эпитоп.

[0009] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть связывается с эпитопом TIGIT человека, который дополнительно содержит одно или более аминокислотных положений 51, 52, 53, 54, 55, 73, 74, 75, 76, 77, 79, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92 или 93. В некоторых вариантах осуществления эпитоп дополнительно содержит один или более аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из Thr51, Ala52, Gln53, Val54, Thr55, Leu73, Gly74, Trp75, His76, Ile77, Pro79, Asp83, Arg84, Val85, Ala86, Pro87, Gly88, Pro89, Gly90, Leu91, Gly92 и Leu93. В некоторых вариантах осуществления эпитоп содержит аминокислотные остатки Thr51, Ala52, Gln53,

Val54, Thr55, Gly74, Trp75, His76, Ile77, Phe81, Lys82, Pro87, Gly88, Pro89, Gly90, Leu91, Gly92 и Leu93. В некоторых вариантах осуществления эпитоп содержит аминокислотные остатки Ala52, Gln53, Leu73, Gly74, Trp75, Pro79, Phe81, Lys82, Asp83, Arg84, Val85 и Ala86. В некоторых вариантах осуществления эпитоп содержит последовательность ICNADLGWHISPSFK (SEQ ID NO:258).

**[0010]** В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть содержат одну или более последовательностей, перечисленных в Таблице 3 ниже. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть содержат одну или более из:

(a) CDR1 тяжелой цепи, содержащую последовательность любой из SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:94, SEQ ID NO:112, SEQ ID NO:130, SEQ ID NO:148, SEQ ID NO:166, SEQ ID NO:184, SEQ ID NO:202, SEQ ID NO:221, SEQ ID NO:224, SEQ ID NO:226, SEQ ID NO:231, SEQ ID NO:233, SEQ ID NO:239 или SEQ ID NO:243;

(b) CDR2 тяжелой цепи, содержащей последовательность любой из SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:114, SEQ ID NO:132, SEQ ID NO:150, SEQ ID NO:168, SEQ ID NO:186, SEQ ID NO:204, SEQ ID NO:222, SEQ ID NO:225, SEQ ID NO:227, SEQ ID NO:229, SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:234, SEQ ID NO:238 или SEQ ID NO:240;

(c) CDR3 тяжелой цепи, содержащей последовательность любой из SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:116, SEQ ID NO:134, SEQ ID NO:152, SEQ ID NO:170, SEQ ID NO:188, SEQ ID NO:206, SEQ ID NO:223, SEQ ID NO:228, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:235, SEQ ID NO:236, SEQ ID NO:237, SEQ ID NO:241, SEQ ID NO:242 или SEQ ID NO:244;

(d) CDR1 легкой цепи, содержащей последовательность любой из SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:121, SEQ ID NO:139, SEQ ID NO:157, SEQ ID NO:175, SEQ ID NO:193 или SEQ ID NO:211;

(e) CDR2 легкой цепи, содержащей последовательность любой из SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:87, SEQ ID NO:105, SEQ ID NO:123, SEQ ID NO:141, SEQ ID NO:159, SEQ ID NO:177, SEQ ID NO:195 или SEQ ID NO:213; или

(f) CDR3 легкой цепи, содержащей последовательность любой из SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:71, SEQ

ID NO:89, SEQ ID NO:107, SEQ ID NO:125, SEQ ID NO:143, SEQ ID NO:161, SEQ ID NO:179, SEQ ID NO:197 или SEQ ID NO:215.

[0011] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие последовательности:

- (a) SEQ ID NO: 4, 6, 8, 13, 15 и 17 соответственно; или
- (b) SEQ ID NO: 22, 24, 26, 31, 33 и 35 соответственно; или
- (c) SEQ ID NO: 40, 42, 44, 49, 51 и 53 соответственно; или
- (d) SEQ ID NO: 58, 60, 62, 67, 69 и 71 соответственно; или
- (e) SEQ ID NO: 76, 78, 80, 85, 87 и 89 соответственно; или
- (f) SEQ ID NO: 94, 96, 98, 103, 105 и 107 соответственно;

или

(g) SEQ ID NO: 112, 114, 116, 121, 123 и 125 соответственно; или

(h) SEQ ID NO: 130, 132, 134, 139, 141 и 143 соответственно; или

(i) SEQ ID NO: 148, 150, 152, 157, 159 и 161 соответственно; или

(j) SEQ ID NO: 166, 168, 170, 175, 177 и 179 соответственно; или

(k) SEQ ID NO: 184, 186, 188, 193, 195 и 197 соответственно; или

(l) SEQ ID NO: 202, 204, 206, 211, 213 и 215 соответственно; или

(m) SEQ ID NO: 221, 222, 223, 13, 15 и 17 соответственно;

или

(n) SEQ ID NO: 224, 225, 62, 67, 69 и 71 соответственно;

или

(o) SEQ ID NO: 226, 227, 228, 67, 69 и 71 соответственно;

или

(p) SEQ ID NO: 224, 229, 230, 67, 69 и 71 соответственно;

или

(q) SEQ ID NO: 224, 227, 230, 67, 69 и 71 соответственно;

или

(r) SEQ ID NO: 231, 232, 235, 103, 105 и 107 соответственно; или

(s) SEQ ID NO: 233, 234, 236, 103, 105 и 107 соответственно; или

(t) SEQ ID NO: 233, 234, 237, 103, 105 и 107 соответственно; или

(u) SEQ ID NO: 166, 238, 170, 175, 177 и 179 соответственно; или

(v) SEQ ID NO: 239, 240, 170, 175, 177 и 179 соответственно; или

(w) SEQ ID NO: 239, 240, 241, 175, 177 и 179 соответственно; или

(x) SEQ ID NO: 239, 240, 242, 175, 177 и 179 соответственно; или

(y) SEQ ID NO: 243, 168, 244, 175, 177 и 179 соответственно.

**[0012]** В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть содержат:

(a) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 245, SEQ ID NO: 246, SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 248, SEQ ID NO: 249, SEQ ID NO: 250, SEQ ID NO: 251, SEQ ID NO: 252, SEQ ID NO: 253, SEQ ID NO: 254, SEQ ID NO: 255, SEQ ID NO: 256 или SEQ ID NO: 257; и/или

(b) переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:136, SEQ ID NO:154, SEQ ID NO:172, SEQ ID NO:190 или SEQ ID NO:208.

**[0013]** В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть содержат:

(a) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 245, и переменную область легкой цепи содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 10; или

(b) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 19, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную

последовательности SEQ ID NO: 28; или

(с) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 37, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 46; или

(d) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 246, SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 248 или SEQ ID NO: 249 и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 64; или

(e) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 73, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 82; или

(f) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 250, SEQ ID NO: 251 или SEQ ID NO: 252 и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 100; или

(g) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 109, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 118; или

(h) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 127, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 136; или

(i) переменную область тяжелой цепи, содержащую

аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 145, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO 154; или

(j) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 253, SEQ ID NO: 254, SEQ ID NO: 255, SEQ ID NO: 256 или SEQ ID NO: 257 и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 172; или

(k) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 181, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 190; или

(l) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 199, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 208.

**[0014]** В другом аспекте предлагаются антитела или их антигенсвязывающие части, которые связываются с TIGIT человека, причем антитело или его антигенсвязывающая часть связывается с эпитопом TIGIT человека, который содержит аминокислотные положения 81 и 82. В некоторых вариантах осуществления эпитоп содержит Phe в положении 81 и/или Lys, или Ser в положении 82. В некоторых вариантах осуществления эпитоп содержит Phe<sup>81</sup> и Lys<sup>82</sup>.

**[0015]** В некоторых вариантах осуществления эпитоп представляет собой прерывистый эпитоп.

**[0016]** В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть связывается с эпитопом TIGIT человека, который дополнительно содержит одно или более аминокислотных положений 51, 52, 53, 54, 55, 73, 74, 75, 76, 77, 79, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92 или 93. В некоторых вариантах осуществления эпитоп дополнительно содержит один или более аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из

Thr51, Ala52, Gln53, Val54, Thr55, Leu73, Gly74, Trp75, His76, Ile77, Pro79, Asp83, Arg84, Val85, Ala86, Pro87, Gly88, Pro89, Gly90, Leu91, Gly92 и Leu93. В некоторых вариантах осуществления эпитоп содержит аминокислотные остатки Thr51, Ala52, Gln53, Val54, Thr55, Gly74, Trp75, His76, Ile77, Phe81, Lys82, Pro87, Gly88, Pro89, Gly90, Leu91, Gly92 и Leu93. В некоторых вариантах осуществления эпитоп содержит аминокислотные остатки Ala52, Gln53, Leu73, Gly74, Trp75, Pro79, Phe81, Lys82, Asp83, Arg84, Val85 и Ala86. В некоторых вариантах осуществления эпитоп содержит последовательность ICNADLGWHISPSFK (SEQ ID NO:258).

[0017] В еще одном аспекте предложены антитела или их антигенсвязывающие части, содержащие одну или более последовательностей, как описано в данном документе (например, одну или более последовательностей, перечисленных в Таблице 3 ниже). В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть содержит еще одну последовательность CDR, вариабельную область тяжелой цепи, вариабельную область легкой цепи или каркасную область, как описано в данном документе (например, как указано в Таблице 3 ниже). В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть содержат одну или более из:

(a) CDR1 тяжелой цепи, содержащую последовательность любой из SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:94, SEQ ID NO:112, SEQ ID NO:130, SEQ ID NO:148, SEQ ID NO:166, SEQ ID NO:184, SEQ ID NO:202, SEQ ID NO:221, SEQ ID NO:224, SEQ ID NO:226, SEQ ID NO:231, SEQ ID NO:233, SEQ ID NO:239 или SEQ ID NO:243;

(b) CDR2 тяжелой цепи, содержащей последовательность любой из SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:114, SEQ ID NO:132, SEQ ID NO:150, SEQ ID NO:168, SEQ ID NO:186, SEQ ID NO:204, SEQ ID NO:222, SEQ ID NO:225, SEQ ID NO:227, SEQ ID NO:229, SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:234, SEQ ID NO:238 или SEQ ID NO:240;

(c) CDR3 тяжелой цепи, содержащей последовательность любой из SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:116, SEQ ID NO:134, SEQ ID NO:152, SEQ ID NO:170, SEQ ID NO:188, SEQ ID NO:206, SEQ ID NO:223, SEQ ID NO:228, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:235, SEQ ID NO:236, SEQ ID NO:237, SEQ ID NO:241, SEQ ID NO:242 или SEQ ID NO:244;

(d) CDR1 легкой цепи, содержащей последовательность любой из SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:121, SEQ ID NO:139, SEQ ID NO:157, SEQ ID NO:175, SEQ ID NO:193 или SEQ ID NO:211;

(e) CDR2 легкой цепи, содержащей последовательность любой из SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:87, SEQ ID NO:105, SEQ ID NO:123, SEQ ID NO:141, SEQ ID NO:159, SEQ ID NO:177, SEQ ID NO:195 или SEQ ID NO:213; или

(f) CDR3 легкой цепи, содержащей последовательность любой из SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:89, SEQ ID NO:107, SEQ ID NO:125, SEQ ID NO:143, SEQ ID NO:161, SEQ ID NO:179, SEQ ID NO:197 или SEQ ID NO:215.

**[0018]** В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие последовательности:

(a) SEQ ID NO: 4, 6, 8, 13, 15 и 17 соответственно; или

(b) SEQ ID NO: 22, 24, 26, 31, 33 и 35 соответственно; или

(c) SEQ ID NO: 40, 42, 44, 49, 51 и 53 соответственно; или

(d) SEQ ID NO: 58, 60, 62, 67, 69 и 71 соответственно; или

(e) SEQ ID NO: 76, 78, 80, 85, 87 и 89 соответственно; или

(f) SEQ ID NO: 94, 96, 98, 103, 105 и 107 соответственно;

ИЛИ

(g) SEQ ID NO: 112, 114, 116, 121, 123 и 125 соответственно; или

(h) SEQ ID NO: 130, 132, 134, 139, 141 и 143 соответственно; или

(i) SEQ ID NO: 148, 150, 152, 157, 159 и 161 соответственно; или

(j) SEQ ID NO: 166, 168, 170, 175, 177 и 179 соответственно; или

(k) SEQ ID NO: 184, 186, 188, 193, 195 и 197 соответственно; или

(l) SEQ ID NO: 202, 204, 206, 211, 213 и 215 соответственно; или

(m) SEQ ID NO: 221, 222, 223, 13, 15 и 17 соответственно;

ИЛИ

(n) SEQ ID NO: 224, 225, 62, 67, 69 и 71 соответственно;

ИЛИ

(o) SEQ ID NO: 226, 227, 228, 67, 69 и 71 соответственно;

ИЛИ

(p) SEQ ID NO: 224, 229, 230, 67, 69 и 71 соответственно;  
ИЛИ

(q) SEQ ID NO: 224, 227, 230, 67, 69 и 71 соответственно;  
ИЛИ

(r) SEQ ID NO: 231, 232, 235, 103, 105 и 107  
соответственно; ИЛИ

(s) SEQ ID NO: 233, 234, 236, 103, 105 и 107  
соответственно; ИЛИ

(t) SEQ ID NO: 233, 234, 237, 103, 105 и 107  
соответственно; ИЛИ

(u) SEQ ID NO: 166, 238, 170, 175, 177 и 179  
соответственно; ИЛИ

(v) SEQ ID NO: 239, 240, 170, 175, 177 и 179  
соответственно; ИЛИ

(w) SEQ ID NO: 239, 240, 241, 175, 177 и 179  
соответственно; ИЛИ

(x) SEQ ID NO: 239, 240, 242, 175, 177 и 179  
соответственно; ИЛИ

(y) SEQ ID NO: 243, 168, 244, 175, 177 и 179  
соответственно.

**[0019]** В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть содержат:

(a) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 245, SEQ ID NO: 246, SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 248, SEQ ID NO: 249, SEQ ID NO: 250, SEQ ID NO: 251, SEQ ID NO: 252, SEQ ID NO: 253, SEQ ID NO: 254, SEQ ID NO: 255, SEQ ID NO: 256 или SEQ ID NO: 257; и/или

(b) переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:136, SEQ ID NO:154, SEQ ID NO:172, SEQ ID NO:190 или SEQ ID NO:208.

**[0020]** В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть содержат:

(a) переменную область тяжелой цепи, содержащую

аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 245, и переменную область легкой цепи содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 10; или

(b) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 19, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 28; или

(c) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 37, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 46; или

(d) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 246, SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 248 или SEQ ID NO: 249 и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 64; или

(e) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 73, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 82; или

(f) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 250, SEQ ID NO: 251 или SEQ ID NO: 252 и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 100; или

(g) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 109, и переменную

область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 118; или

(h) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 127, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 136; или

(i) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 145, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO 154; или

(j) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 253, SEQ ID NO: 254, SEQ ID NO: 255, SEQ ID NO: 256 или SEQ ID NO: 257 и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 172; или

(k) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 181, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 190; или

(l) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 199, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 208.

**[0021]** В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть, как описано в данном документе, проявляет синергизм с антителом к PD1 или антителом к PD-L1.

**[0022]** В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть, как описано в данном документе, представляет собой моноклональное антитело. В некоторых

вариантах осуществления антитело представляет собой гуманизированное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой полностью антитело человека. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой химерное антитело. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab, F(ab')<sub>2</sub>, scFv или двухвалентный scFv.

[0023] В другом аспекте предлагаются фармацевтические композиции, содержащие изолированное антитело или его антигенсвязывающую часть, как описано в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

[0024] В еще одном аспекте предлагаются биспецифические антитела, содержащие изолированное антитело или его антигенсвязывающую часть, как описано в данном документе.

[0025] В еще одном аспекте предлагаются конъюгаты антитело-лекарственное средство, содержащие изолированное антитело или его антигенсвязывающую часть, как описано в данном документе.

[0026] В еще одном аспекте предлагаются выделенные полинуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит одну или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих антитело или его антигенсвязывающую часть, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит одну или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих полипептид, описанный в Таблице 3 ниже. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит одну или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих антитело или его антигенсвязывающую часть, которая связывается с TIGIT человека, причем выделенный полинуклеотид содержит:

(a) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:92, SEQ ID NO:110, SEQ ID NO:128, SEQ ID NO:146, SEQ ID NO:164, SEQ ID NO:182 или SEQ ID NO:200; и/или

(b) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:119, SEQ ID NO:137, SEQ ID NO:155, SEQ ID NO:173, SEQ ID NO:191 или SEQ ID NO:209.

[0027] В еще одном аспекте предлагаются векторы и клетки-хозяева, содержащие полинуклеотид, как описано в данном документе. В другом аспекте предлагаются способы получения

антитела, включающие культивирование клетки-хозяина, как описано в данном документе, в условиях, подходящих для продуцирования антитела.

[0028] В другом аспекте предлагаются наборы (например, для применения в качестве терапевтического способа, как описано в данном документе). В некоторых вариантах осуществления набор содержит изолированное антитело к TIGIT или его антигенсвязывающую часть, как описано в данном документе, или фармацевтическую композицию, содержащую антитело к TIGIT или его антигенсвязывающую часть, как описано в данном документе; и дополнительно содержит иммуноонкологический агент. В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологический агент представляет собой ингибитор пути PD-1. В некоторых вариантах осуществления ингибитор пути PD-1 представляет собой антитело к PD1 или антитело к PD-L1. В некоторых вариантах осуществления ингибитор пути PD-1 представляет собой антагонист или ингибитор коингибитора T-клеток. В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологический агент представляет собой агонист коактиватора T-клеток. В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологический агент представляет собой иммуностимулирующий цитокин.

[0029] В другом аспекте предлагаются способы лечения рака у субъекта. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту терапевтического количества выделенного антитела или его антигенсвязывающей части, как описано в данном документе, или фармацевтической композиции, как описано в данном документе, биспецифического антитела, как описано в данном документе, или конъюгата антитело-лекарственное средство, как описано в данном документе.

[0030] В некоторых вариантах осуществления раком является рак, который имеет повышенную экспрессию CD112 и/или CD115. В некоторых вариантах осуществления раком является рак, который обогащен T-клетками или клетками-натуральными киллерами (NK), которые экспрессируют TIGIT. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак матки, рак шейки матки, рак яичника, рак простаты, рак яичка, рак пищевода, рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак толстой кишки, рак почки, рак головы и шеи, рак легких, рак желудка, рак половых клеток, рак кости, рак печени, рак щитовидной железы, рак кожи,

новообразование центральной нервной системы, лимфому, лейкоз, миелому или саркому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой лимфому или лейкоз.

**[0031]** В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту терапевтического количества иммуноонкологического агента. В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологический агент представляет собой ингибитор пути PD-1. В некоторых вариантах осуществления ингибитор пути PD-1 представляет собой антитело к PD1 или антитело к PD-L1. В некоторых вариантах осуществления ингибитор пути PD-1 представляет собой антагонист или ингибитор коингибитора Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологический агент представляет собой агонист коактиватора Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологический агент представляет собой иммуностимулирующий цитокин. В некоторых вариантах осуществления изолированное антитело, фармацевтическую композицию, биспецифическое антитело или конъюгат антитело-лекарственное средство вводят одновременно с иммуноонкологическим агентом. В некоторых вариантах осуществления изолированное антитело, фармацевтическую композицию, биспецифическое антитело или конъюгат антитело-лекарственное средство вводят последовательно после иммуноонкологического агента.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

**[0032] Фиг. 1.** Связывание 65 клонов антител к TIGIT и нерелевантного антитела изотипического контроля с клетками НЕК 293, сконструированными для экспрессии TIGIT человека (верхняя панель), TIGIT яванского макака (средняя панель) и TIGIT мыши (нижняя панель).

**[0033] Фиг. 2.** Связывание 65 клонов антител к TIGIT и нерелевантного антитела изотипического контроля с первичными Т-клетками человека (верхняя панель), Т-клетками яванского макака (средняя панель) и Т-клетками мыши (нижняя панель). Для нижней панели было оценено 35 из 65 клонов. Из 35 оцененных клонов, 5 из 35 не связывали белок mTIGIT-Fc (клоны 20, 27, 55, 56 и 60), как показано светло-зелеными столбиками.

**[0034] Фиг. 3А-3D.** (А-С) Значения титрования связывания восьми клонов антител к TIGIT (клоны 2, 5, 13, 16, 17, 20, 25 и 54) с TIGIT человека (А), мыши (В) и яванского макака (С), экспрессируемого на поверхности клеток НЕК 293. Результаты

показаны для отдельных лунок. (D) Значения EC50 восьми клонов антител к TIGIT (клоны 2, 5, 13, 16, 17, 20, 25 и 54) с TIGIT человека, мыши и яванского макака, экспрессируемого на поверхности клеток НЕК 293.

[0035] **Фиг. 4.** Титрование связывания клонов 13 и 25 антител к TIGIT с активированными Т-клетками селезенки мыши. Результаты показаны для отдельных лунок. Клон 13 имел EC50 0,24 мкг/мл. Клон 25 имел EC50 2,28 мкг/мл.

[0036] **Фиг. 5А–5В.** антитела к TIGIT блокировали взаимодействие CD155 с TIGIT, экспрессируемым на поверхности клеток НЕК 293, как для связывания человеческого CD155 с клетками НЕК 293, экспрессирующими TIGIT человека (А), так и для связывания CD155 мыши с клетками НЕК 293, экспрессирующими TIGIT мыши (В). Результаты показаны для отдельных лунок.

[0037] **Фиг. 6.** антитела к TIGIT блокировали взаимодействие CD112 человека с TIGIT человека, экспрессируемого на поверхности клеток НЕК 293. Результаты показаны для отдельных лунок.

[0038] **Фиг. 7А–7В.** (А) Верхняя панель: Отдельные антитела к TIGIT эффективно блокировали захват TIGIT-CD155, что приводило к активации Т-клеток, что измерялось в > 1,5-кратной индукции активности люциферазы. Около 12 клонов показали > 1,5-кратную индукцию в биоанализе. Два клона не блокировали взаимодействие TIGIT-CD155 в анализе ForteBio (розовые столбцы). Кратность индукции измерялась относительно контрольного антитела (Ab). Среднее и СО (SD) определены из двойных экспериментов; антитела были в концентрации 20 мкг/мл. Серая полоса=изотипический контроль hIgG1. Черная полоса=нет контроля антител (определяется как базовый уровень). Нижняя панель: Корреляционный график биоанализа блокировки TIGIT/CD155 в зависимости от аффинности TIGIT-Fc. Активность в биоанализе коррелирует с аффинностью к рекомбинантному белку. (В) Дозозависимость 12 отобранных клонов анти-TIGIT в биоанализе блокировки TIGIT/CD155. Клоны 13 и 25, которые показали сильное связывание со всеми тремя видами, показали хорошую активность в биоанализе. Среднее и СО (SD) определены в трипликатах лунок.

[0039] **Фиг. 8.** Отдельные антитела к TIGIT проявляли синергизм с анти-PD-1, что приводило к активации Т-клеток. Среднее и СО (SD) определены в трипликатах лунок. Клон 13 и клон 25 оба проявили синергизм с анти-PD-1 в комбинированной биопробе.

**[0040] Фиг. 9А–9Н.** (А–D) Титрование связывания (А–С) и значения EC50 (D) для связывания с TIGIT человека (А), мыши (В) и яванского макака (С), экспрессируемого на поверхности клеток НЕК 293 для полностью человеческого анти-TIGIT клона 13 («с13 hIgG1») и химерного мышинового IgG1 («с13 mIgG1») и мышинового IgG2a («с13 mIgG2a») клона 13. Среднее и CO (SD) определены в дубликатах лунок. (Е–F) Антитела с13 hIgG1, с13 mIgG1 и с13 mIgG2a блокировали взаимодействие CD155 с TIGIT, экспрессируемым на поверхности клеток НЕК 293, как для связывания CD155 человека с клетками НЕК 293, экспрессирующими TIGIT человека (Е), так и для связывания CD155 мыши с клетками НЕК 293, экспрессирующими TIGIT мыши (F). Результаты показаны для отдельных лунок. (G) Антитела с13 hIgG1, с13 mIgG1 и с13 mIgG2a блокировали взаимодействие CD112 человека с TIGIT человека, экспрессируемого на поверхности клеток НЕК 293. Результаты показаны для отдельных лунок. (H) Дозозависимый эффект родительских и химерных клонов антител к TIGIT с1313 hIgG1, с13 mIgG1 и с13 mIgG2a в биоанализе блокады TIGIT/CD155. Среднее и SD определены в трипликатах лунок.

**[0041] Фиг. 10А–10К.** антитела к TIGIT, которые могут задействовать активацию Fcγ рецепторов, опосредовали противоопухолевую эффективность в модели сингенной опухоли СТ26 у мышей. (А) Среднее групповое значение объема опухоли. (В–К) Индивидуальный объем опухоли животного для групп с 1 по 10. PR=частичный ответ (объем опухоли составляет 50% или менее от ее объема в 1 день для трех последовательных измерений и равен или превышает 13,5 мм<sup>3</sup> для одного или более из этих трех измерений). CR=полный ответ (объем опухоли составляет менее 13,5 мм<sup>3</sup> для трех последовательных измерений).

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

##### I. ВВЕДЕНИЕ

**[0042]** Как описано в данном документе, антитела, имеющие высокое сродство к TIGIT человека (Т-клеточному иммунорецептору с Ig и ITIM доменами), и дополнительно имеющие перекрестную реактивность с одним или двумя из TIGIT мыши и TIGIT яванского макака, были идентифицированы как ингибирующие взаимодействие между TIGIT и CD155. Данные антитела также проявляют синергизм с антителами к PD-1. Таким образом, антитела к TIGIT, описанные в данном документе, могут быть использованы в ряде терапевтических применений, таких как лечение различных видов рака, либо в виде

отдельного агента, либо в комбинации с другим терапевтическим агентом, таким как анти-PD-1 агенты или анти-PD-L1 агенты.

[0043] Соответственно, в одном аспекте настоящее изобретение относится к композициям, наборам и способам лечения, включающим антитело или антигенсвязывающую часть антитела, которое связывается с TIGIT человека.

## II. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[0044] Если не указано иное, технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое же значение, которое обычно подразумевается специалистом в данной области техники. См., e.g., Lackie, *DICTIONARY OF CELL AND MOLECULAR BIOLOGY*, Elsevier (4<sup>th</sup> ed. 2007); Sambrook et al., *MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL*, Cold Springs Harbor Press (Cold Springs Harbor, NY 1989). Любые способы, устройства и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в данном документе, могут быть использованы при практическом применении данного изобретения. Следующие определения предоставлены для облегчения понимания определенных терминов, часто используемых в данном документе, и не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения.

[0045] Употребляемые в данном документе формы единственного числа включают ссылки на формы множественного числа, если из контекста явно не следует иное. Таким образом, например, ссылка на «антитело» необязательно включает комбинацию двух или более таких молекул и тому подобное.

[0046] Термин «около», используемый в данном описании, относится к обычному диапазону ошибок для соответствующего значения, хорошо известного специалисту в данной области техники.

[0047] Термин «TIGIT», в контексте данного документа, относится к «Т-клеточному иммунорецептору с Ig и ITIM доменами». Белок, кодируемый геном TIGIT, является членом семейства CD28 в суперсемействе Ig белков. TIGIT экспрессируется на поверхности клеток нескольких классов Т-клеток и на поверхности клеток естественных киллеров (NK), и опосредует его иммуносупрессивный эффект конкурируя с CD226 за лиганды CD155 и CD112. См., Levin et al., *Eur. J. Immunol.*, 2011, 41:902-915. TIGIT также упоминается в данной области техники как WUCAM (Washington University Cell Adhesion Molecule - молекула клеточной адгезии Вашингтонского университета) и VSTM3 (обозначение Международной

организации по изучению генома человека). См., Levin et al., *Eur J Immunol*, 2011, 41:902–915. Соответственно, ссылка на «TIGIT» по всей данной заявке также включает ссылку на WUCAM и/или VSTM3, если иное не указано или не очевидно из контекста. Нуклеотидные и белковые последовательности TIGIT человека представлены, например, в регистрационных номерах базы генетических данных NM173799 (SEQ ID NO: 217) и NP776160 (SEQ ID NO: 218), соответственно.

**[0048]** Термин «рак» относится к заболеванию, которое характеризуется неконтролируемым ростом аберрантных клеток. Термин включает все известные виды рака и опухолевые состояния, независимо от того, характеризуются ли они как злокачественные, доброкачественные, мягкотканевые или солидные, а также виды рака всех стадий и степеней, включая пре- и пост-метастатический рак. Примеры различных типов рака включают, но не ограничиваются ими, рак пищеварительной системы и желудочно-кишечного тракта, такой как рак желудка (например, рак желудка), колоректальный рак, желудочно-кишечные стромальные опухоли, желудочно-кишечные карциноидные опухоли, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак анального канала, рак желчного протока, рак тонкой кишки и рак пищевода; рак молочной железы; рак легких; рак желчного пузыря; рак печени; панкреатический рак; рак аппендикса; рак простаты, рак яичников; рак почки; рак центральной нервной системы; рак кожи (например, меланома); лимфомы; глиомы; хориокарциному; рак головы и шеи; остеогенные саркомы; и рак крови. Термин «опухоль», в контексте данного документа, включает одну или более раковых клеток.

**[0049]** Термин «антитело» относится к полипептиду, который кодируется геном иммуноглобулина, или их функциональным фрагментам, которые специфически связываются и распознают антиген (например, TIGIT человека), определенный маркер клеточной поверхности или любую желаемую мишень. Как правило, «вариабельная область» содержит антигенсвязывающую область антитела (или его функциональный эквивалент) и является наиболее важной в отношении специфичности и аффинности связывания. См., *Fundamental Immunology 7<sup>th</sup> Edition*, Paul, ed., Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins (2013). Известные гены иммуноглобулина включают гены константных областей каппа, лямбда, альфа, гамма, дельта, эпсилон и мю, а также множество генов вариабельных областей иммуноглобулинов. Легкие цепи

классифицируются на каппа или лямбда. Тяжелые цепи классифицируются как гамма, мю, альфа, дельта или эpsilon, которые, в свою очередь, определяют классы иммуноглобулинов, IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, соответственно.

[0050] Типичная структурная единица иммуноглобулина (антитела) содержит тетрамер. Каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, каждая из которых имеет одну «легкую» (около 25 кДа) и одну «тяжелую» цепь (около 50–70 кДа). N-конец каждой цепи определяет переменную область от около 100 до 110 или более аминокислот, в основном ответственных за распознавание антигена. Термины переменная легкая цепь ( $V_L$ ) и переменная тяжелая цепь ( $V_H$ ) относятся к этим легким и тяжелым цепям соответственно.

[0051] «Изотип» представляет собой класс антител, определяемых константной областью тяжелой цепи. Гены иммуноглобулина включают гены константной области каппа, лямбда, альфа, гамма, дельта, эpsilon и мю. Легкие цепи классифицируются на каппа или лямбда. Тяжелые цепи классифицируются как гамма, мю, альфа, дельта или эpsilon, которые, в свою очередь, определяют классы изотипов, IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, соответственно.

[0052] Термин «область, определяющая комплементарность (CDR)», в контексте данного документа, относится к трем гиперпеременным областям в каждой цепи, которые прерывают четыре «каркасные» области, определяемые переменными областями легкой и тяжелой цепи. CDR главным образом ответственны за связывание с эпитопом антигена. CDR каждой цепи обычно обозначают как CDR1, CDR2 и CDR3, пронумерованные последовательно, начиная с N-конца, и также обычно идентифицируются указанием цепи, в которой находится конкретная CDR. Таким образом,  $V_H$  CDR3 расположена в переменном домене тяжелой цепи антитела, в котором она находится, тогда как  $V_L$  CDR1 представляет собой CDR1 из переменного домена легкой цепи антитела, в котором она находится.

[0053] Последовательности каркасных областей различных легких или тяжелых цепей относительно консервативны в пределах вида. Каркасная область антитела, то есть, объединенные каркасные области составляющих легкой и тяжелой цепей, служит для локализации и выравнивания CDR в трехмерном пространстве.

[0054] Аминокислотные последовательности CDR и каркасных

областей могут быть определены с использованием различных хорошо известных в данной области техники определений, например, Кабат, Чотиа, международной базы данных ImMunoGeneTics (IMGT) и AbM (см., например, Johnson and Wu, *Nucleic Acids Res.* 2000 Jan 1; 28(1): 214-218 и Johnson et al., *Nucleic Acids Res.*, 29:205-206 (2001); Chothia & Lesk, (1987) *J. Mol. Biol.* 196, 901-917; Chothia et al. (1989) *Nature* 342, 877-883; Chothia et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 227, 799-817; Al-Lazikani et al., *J.Mol.Biol* 1997, 273(4)). Если не указано иное, CDR определяют по Кабату. Определения активных центров антитела, также описаны ниже в: Ruiz et al. *Nucleic Acids Res.*, 28, 219-221 (2000); and Lefranc *Nucleic Acids Res.* Jan 1;29(1):207-9 (2001); MacCallum et al., *J. Mol. Biol.*, 262: 732-745 (1996); и Martin et al, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 86, 9268-9272 (1989); Martin, et al, *Methods Enzymol.*, 203: 121-153, (1991); Pedersen et al, *Immunomethods*, 1, 126, (1992); и Rees et al, In Sternberg M.J.E. (ed.), *Protein Structure Prediction*. Oxford University Press, Oxford, 141-172 (1996).

**[0055]** Термины «антигенсвязывающая часть» или «антигенсвязывающий фрагмент» используются в настоящем описании взаимозаменяемо и относятся к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном (например, TIGIT). Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может выполняться фрагментами полноразмерного антитела. Примеры антигенсвязывающих фрагментов включают, но не ограничиваются ими, фрагмент Fab (моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1), фрагмент F(ab')<sub>2</sub> (двухвалентный фрагмент, содержащий два связанных фрагмента Fab с помощью дисульфидного мостика в шарнирной области), одноцепочечной Fv (scFv), определяющих комплементарность областей (CDR), VL (вариабельная область легкой цепи), VH (вариабельная область тяжелой цепи), дисульфид-связанных Fvs (dsFv) и любой комбинации этих или любой другой функциональной части пептида иммуноглобулина, способного связываться с антигеном-мишенью (см., например, *Fundamental Immunology*, выше). Как понятно специалисту в данной области техники, различные фрагменты антител могут быть получены различными способами, например, расщеплением интактного антитела ферментом, таким как пепсин; или синтезом de novo. Фрагменты антител часто синтезируют de novo либо химическим способом, либо

с использованием методологии рекомбинантной ДНК. Таким образом, термин антитело, используемый в данном документе, включает фрагменты антител, полученные либо путем модификации целых антител, либо синтезированные de novo с использованием методик рекомбинантной ДНК (например, одноцепочечные Fv), или фрагменты, идентифицированные с использованием библиотек фагового дисплея и дрожжевой библиотеки презентаций антитела (см., например, McCafferty et al., (1990) *Nature* 348:552; Y. Xu et al., PIDS, 2013, 26:663-670; WO 2009/036379; WO 2010/105256 и WO 2012/009568). Термин «антитело» также включает двухвалентные или биспецифичные молекулы, диатела, триатела и тетратела. Бивалентные и биспецифичные молекулы описаны, например, в Kostelny et al. (1992) *J. Immunol.* 148:1547, Pack and Pluckthun (1992) *Biochemistry* 31:1579, Hollinger et al. (1993), *PNAS. USA* 90:6444, Gruber et al. (1994) *J Immunol.* 152:5368, Zhu et al. (1997) *Protein Sci.* 6:781, Hu et al. (1996) *Cancer Res.* 56:3055, Adams et al. (1993) *Cancer Res.* 53:4026, и McCartney, et al. (1995) *Protein Eng.* 8:301.

**[0056]** Термин «моноклональное антитело» относится к клональному получению антител с одной специфичностью связывания и сродством к данному эпитопу на антигене. Термин «поликлональное антитело» относится к препарату антител, которые вырабатываются против одного антигена, но с различными специфичностями и аффинностями связывания.

**[0057]** «Гуманизированное» антитело представляет собой антитело, которое сохраняет реактивность нечеловеческого антитела, но в то же время менее иммуногенно у человека. Это может быть достигнуто, например, путем сохранения нечеловеческих областей CDR и замены остальных частей антител их человеческими копиями. См., например, Morrison et al., *PNAS USA*, 81:6851-6855 (1984); Morrison and Oi, *Adv. Immunol.*, 44:65-92 (1988); Verhoeven et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988); Padlan, *Molec. Immun.*, 28:489-498 (1991); Padlan, *Molec. Immun.*, 31(3):169-217 (1994).

**[0058]** Термин «химерное антитело», в контексте данного описания, относится к молекуле антитела, в котором (а) константная область или ее часть изменена, заменена или обменена, так что сайт связывания антигена (вариабельной области, CDR или его части) связан с константной областью другого или измененного класса, эффекторной функцией и/или вида,

или с совершенно другой молекулой, которая придает химерному антителу новые свойства (например, фермента, токсина, гормона, фактора роста, лекарственного средства и т.д.); или (b) переменная область или ее часть изменена, заменена или обменена на переменную область, имеющую различную или измененную антигенную специфичность (например, CDR и каркасные области от разных видов).

[0059] Термин «эпитоп» относится к области или региону антигена, с которым антитело специфически связывается, то есть, области или региона в физическом контакте с антителом, и может включать несколько аминокислот или части нескольких аминокислот, например, 5 или 6, или более, например, 20 или более аминокислот, или части этих аминокислот. В некоторых случаях эпитоп включает в себя небелковые компоненты, например, выбранные из углевода, нуклеиновой кислоты или липида. В некоторых случаях эпитоп представляет собой трехмерный фрагмент. Таким образом, например, когда мишенью является белок, эпитоп может состоять из последовательных аминокислот или аминокислот из разных частей белка, которые сближаются при укладке белка (например, прерывистый эпитоп). То же самое верно и для других типов молекул-мишеней, которые образуют трехмерные структуры.

[0060] Термин «специфически связывает» относится к молекуле (например, антителу или фрагменту антитела), которая связывается с мишенью с большей аффинностью, авидностью, более легко и/или с большей продолжительностью по отношению к этой мишени в образце, чем она связывается с нецелевым соединением. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть, которое специфически связывается с мишенью, представляет собой антитело или антигенсвязывающую часть, которое связывается с мишенью с по меньшей мере в 2-раза большей аффинностью, чем с нецелевыми соединениями, например, с по меньшей мере в 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 20 раз, 25 раз, 50 раз или 100 раз большей аффинностью. Например, антитело, которое специфически связывается с TIGIT, обычно связывается с TIGIT с по меньшей мере в 2 раза большей аффинностью, чем с мишенью, которая не является TIGIT. Специалисту в данной области техники будет понятно, что после прочтения данного определения, например, антитело (или фрагмент или эпитоп), которое специфически или предпочтительно связывается с первой мишенью, может или не может специфически или предпочтительно связываться

со второй мишенью.

[0061] Термин «аффинность связывания» используется в данном документе в качестве определения меры прочности нековалентного взаимодействия между двумя молекулами, например, антитела или его фрагмента, и антигеном. Термин «аффинность связывания» используется для описания одновалентных взаимодействий (внутренней активности).

[0062] Аффинность связывания между двумя молекулами, например, антителом или его фрагментом, и антигеном посредством моновалентного взаимодействия может быть количественно определена путем определения константы диссоциации ( $K_D$ ). В свою очередь,  $K_D$  может быть определена путем измерения кинетики образования и диссоциации комплекса с использованием, например, метода поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (Biacore™). Константы скорости, соответствующие ассоциации и диссоциации одновалентного комплекса, называют константами скорости ассоциации  $k_a$  (или  $k_{on}$ ) и константой скорости диссоциации  $k_d$  (или  $k_{off}$ ) соответственно.  $K_D$  относится к  $k_a$  и  $k_d$  через уравнение  $K_D = k_d / k_a$ . Значение константы диссоциации может быть определено непосредственно с помощью известных способов и может быть вычислено даже для сложных смесей такими способами, как, например, изложено в Caseci et al. (1984, *Byte* 9: 340–362). Например,  $K_D$  может быть установлена с использованием анализа связывания нитроцеллюлозного фильтра с двумя фильтрами, например, как описано в Wong & Lohman (1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5428–5432). Другие стандартные анализы для оценки связывающей способности лигандов, таких как антитела, с антигенами-мишеням известны в данной области техники, включая, например, иммуноферментный анализ (ИФА), вестерн-блоты, радиоиммунный анализ (РИА) и анализ с помощью проточной цитометрии, а также другие анализы, приведенные в качестве примеров в другой части данного документа. Кинетика связывания и аффинность связывания антитела также могут быть оценены с помощью стандартных анализов, известных в данной области техники или описанных в разделе «Примеры» ниже, таких как поверхностный плазмонный резонанс (SPR), например, с использованием системы Biacore™; анализы кинетического исключения, такие как KinExA®; и биослойная интерферометрия (например, с использованием платформы ForteBio® Octet). В некоторых вариантах осуществления аффинность определяют с использованием биослойной интерферометрии. См.,

например, Wilson et al., *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 38:400–407 (2010); Dysinger et al., *J. Immunol. Methods*, 379:30–41 (2012); и Estep et al., *Mabs*, 2013, 5:270–278.

[0063] Термин «вступать в перекрестную реакцию», в контексте данного документа, относится к способности антитела связываться с антигеном отличным от антигена, против которого было выработано антитело. В некоторых вариантах осуществления перекрестная специфичность относится к способности антитела связываться с антигеном другого вида, чем антиген, против которого было выработано антитело. В качестве неограничивающего примера, антитело к TIGIT, как описано в данном документе, которое вырабатывается против TIGIT антигена человека, может проявлять перекрестную специфичность с TIGIT другого вида (например, мыши или обезьяны).

[0064] Термины «полипептид», «пептид» и «белок» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения полимера состоящего из аминокислотных остатков. Термины применяются к полимерам аминокислот, в которых один или более аминокислотных остатков представляют собой искусственный химический имитатор соответствующей встречающейся в природе аминокислоты, а также встречающихся в природе аминокислотным полимерам и не встречающихся в природе полимерам аминокислот. В контексте данного документа данные термины охватывают аминокислотные цепи любой длины, включая полноразмерные белки, причем аминокислотные остатки связаны ковалентными пептидными связями.

[0065] Термин «аминокислота» относится к аминокислотам природного и искусственного происхождения, а также к аналогам аминокислот и имитаторам аминокислот, которые функционируют подобно аминокислотам природного происхождения. Встречающиеся в природе аминокислоты представляют собой те, которые кодируются генетическим кодом, а также те аминокислоты, которые позднее модифицируются, например, гидроксипролин,  $\gamma$ -карбоксиглутамат и O-фосфосерин. Аналоги аминокислот представляют собой соединения, которые обладают сходной базовой химической структурой, как у аминокислот природного происхождения, т. е.  $\alpha$  углерод, который связан с водородом, карбоксильная группа, аминогруппа и R-группа, например, гомосерин, норлейцин, метионина сульфоксид, метионинметилсульфоний. Такие аналоги содержат модифицированные

R группы (например, норлейцин) или модифицированные пептидные остовы, но сохраняют сходную базовую химическую структуру, как у аминокислот природного происхождения. «Аминокислотные имитаторы (миметики)» относятся к химическим соединениям, которые имеют структуру, которая отличается от общей химической структуры аминокислоты, но которая функционирует подобно природной аминокислоте.

[0066] Аминокислоты могут называться в данном документе либо своими обычно известными трехбуквенными обозначениями, либо однобуквенными обозначениями, рекомендованными Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB. Аналогично, нуклеотиды могут называться по их обычно принятым однобуквенным кодам.

[0067] Термины «нуклеиновая кислота» и «полинуклеотид», в контексте данного документа, взаимозаменяемо относятся к цепи нуклеотидов любой длины и включают ДНК и РНК. Нуклеотиды могут представлять собой дезоксирибонуклеотиды, рибонуклеотиды, модифицированные нуклеотиды или основания, и/или их аналоги, или любой субстрат, который может быть включен в цепь ДНК или РНК-полимеразы. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и их аналоги. Примеры рассматриваемых в данном документе полинуклеотидов включают одноцепочечную и двухцепочечную ДНК, одноцепочечную и двухцепочечную РНК и гибридные молекулы, содержащие смеси одноцепочечной и двухцепочечной ДНК и РНК.

[0068] Термин «изолированный», используемый со ссылкой на нуклеиновую кислоту или белок (например, антитело), означает, что нуклеиновая кислота или белок, по существу, свободны от других клеточных компонентов, с которыми они связаны в естественном состоянии. Это предпочтительно в гомогенном состоянии. Это может относиться к сухому порошку или водному раствору. Чистота и однородность обычно определяются с использованием методов аналитической химии, например, электрофорез в полиакриламидном геле или высокоэффективная жидкостная хроматография. Белок, который является преобладающим видом, присутствующим в препарате, по существу является очищенным. В частности, изолированный ген отделен от открытых рамок считывания, которые фланкируют ген и кодируют белки, отличные от белка, кодируемого интересующим геном. Термин «очищенный» означает, что нуклеиновая кислота или белок дают по существу одну полосу в электрофорезном геле. В частности, это

означает, что нуклеиновая кислота или белок имеют чистоту по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 95% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 99%.

[0069] Термин «иммуноонкологический агент» относится к агенту, который усиливает, стимулирует или активизирует иммунный ответ против рака у субъекта (например, в стимуляции иммунного ответа для ингибирования роста опухоли). В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологический агент представляет собой небольшую молекулу, антитело, пептид, белок, кольцевой пептид, пептидомиметик, полинуклеотид, ингибирующую РНК, аптамер, лекарственное соединение или другое соединение. В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологический агент представляет собой антагонист или ингибитор PD-1 или пути PD-1.

[0070] Термины «субъект», «пациент», «индивидуум» и тому подобное используются взаимозаменяемо и относятся, за исключением случаев, где указано, к млекопитающим, таким как люди и приматы, не являющиеся людьми, а также к кроликам, крысам, мышам, козам, свиньям и другим видам млекопитающих. Термин не обязательно указывает, что у субъекта было диагностировано определенное заболевание, но обычно относится к человеку под наблюдением врача. Пациентом может быть человек, который нуждается в лечении, наблюдении, корректировке или модификации существующей схемы лечения и т.д.

[0071] Термины «терапия», «лечение» и «улучшение» относятся к любому снижению тяжести симптомов. В случае лечения рака лечение может относиться к уменьшению, например, размера опухоли, количества раковых клеток, скорости роста, метастатической активности, гибели нераковых клеток и т.д. Термины «лечить» и «предотвращать», в контексте данного документа, не предназначены для обозначения абсолютных терминов. Лечение и профилактика могут включать любую задержку начала, улучшение симптомов, улучшение выживаемости пациентов, увеличение времени или частоты выживания и т. д. Лечение и профилактика могут быть полными (не обнаруживаемые симптомы остаются) или частичными, так что симптомы встречаются реже или они являются менее тяжелыми, чем у пациента, не получающего лечения, описанного в данном документе. Эффект лечения можно сравнить с индивидуумом или группой лиц, не получающих лечение, или с тем же пациентом до лечения или в другое время во время лечения. В некоторых аспектах тяжесть заболевания снижается по

меньшей мере на 10% по сравнению, например, с индивидуумом перед введением или контрольным индивидуумом, не проходящим лечение. В некоторых аспектах тяжесть заболевания снижается по меньшей мере на 25%, 50%, 75%, 80% или 90%, или в некоторых случаях более не выявляется с использованием стандартных диагностических методов.

[0072] Термин «терапевтическое количество» или «терапевтически эффективное количество» агента (например, антитела, как описано в данном документе), в контексте данного документа, представляет собой количество агента, который предотвращает, ослабляет, облегчает или уменьшает тяжесть симптомов заболевания (например, рака) у субъекта. Например, для данного параметра терапевтически эффективное количество будет демонстрировать увеличение или уменьшение терапевтического эффекта по меньшей мере на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 90% или не менее 100%. Терапевтическая эффективность также может быть выражена как «кратное» увеличение или уменьшение. Например, терапевтически эффективное количество может иметь по меньшей мере 1,2-кратное, 1,5-кратное, 2-кратное, 5-кратное или более влияние по сравнению с контролем.

[0073] Термины «вводить», «введенный» или «введение» относятся к способам доставки агентов, соединений или композиций до нужного места биологического действия. Данные способы включают, но не ограничиваются ими, местную доставку, парентеральную доставку, внутривенную доставку, внутрикожную доставку, внутримышечную доставку, доставку в толстую кишку, ректальную доставку или интраперитонеальную доставку. Способы введения, которые необязательно используются с агентами и способами, описанными в данном документе, включают, например, обсуждаемые в Goodman and Gilman, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, current ed.; Pergamon; and Remington's, *Pharmaceutical Sciences* (current edition), Mack Publishing Co., Easton, PA.

### III. АНТИТЕЛА К TIGIT

[0074] В одном аспекте предложены антитела или антигенсвязывающие части антител, которые связываются с TIGIT человека (T-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и ITIM). В некоторых вариантах осуществления в контексте данного документа, антитело к TIGIT ингибирует взаимодействие между TIGIT и одним или двумя лигандами CD155 и CD112. В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT ингибирует взаимодействие между

TIGIT и CD155 в ходе функционального биоанализа, позволяя происходить передаче сигналов CD155-CD226. В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT проявляет синергизм с анти-PD-1 агентом (например, антитело к PD-1m) или анти-PD-L1 агентом (например, анти-PD-L1 антителом).

Характеристики антител к TIGIT

[0075] В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT связывается с человеческим TIGIT белком (SEQ ID NO: 218) или его частью с высокой аффинностью. В некоторых вариантах осуществления антитело обладает аффинностью связывания ( $K_D$ ) с TIGIT человека менее 5 нМ, менее 1 нМ, менее 500 пМ, менее 250 пМ, менее 150 пМ, менее 100 пМ, менее чем 50 пМ, менее 40 пМ, менее 30 пМ, менее 20 пМ или менее около 10 пМ. В некоторых вариантах осуществления антитело имеет аффинность связывания ( $K_D$ ) с TIGIT человека менее чем 50 пМ. В некоторых вариантах осуществления антитело имеет  $K_D$  для аффинности связывания с TIGIT человека в диапазоне от около 1 пМ до около 5 нМ, например, от около 1 пМ до около 1 нМ, от около 1 пМ до около 500 пМ, от около 5 пМ до около 250 пМ или от около 10 пМ до около 100 пМ.

[0076] В некоторых вариантах осуществления в дополнении к связыванию с TIGIT человека с высоким сродством, антитело к TIGIT демонстрирует перекрестную реактивность с TIGIT яванского макака («супо») (например, с TIGIT супо, имеющим последовательность SEQ ID NO: 219) и/или TIGIT мыши (например, с TIGIT мыши, имеющим последовательность SEQ ID NO: 220). В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT связывается с TIGIT мыши (например, TIGIT мыши, имеющим последовательность SEQ ID NO: 220) с аффинностью связывания ( $K_D$ ) 100 нМ или менее. В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT связывается с TIGIT человека с  $K_D$ , равной 5 нМ или менее, и перекрестно реагирует с TIGIT мыши с  $K_D$ , равной 100 нМ или менее. В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT, которое связывается с TIGIT человека, также проявляет перекрестную реактивность как с TIGIT яванского макака, так и с TIGIT мыши.

[0077] В некоторых вариантах осуществления перекрестную реактивность антитела определяют путем обнаружения специфического связывания антитела к TIGIT с TIGIT, который экспрессируется на поверхности клетки (например, клеточная линия, которая экспрессируется TIGIT человека, TIGIT супо или TIGIT мыши, или первичная клетка, которая эндогенно

экспрессирует TIGIT, например, первичные Т-клетки, которые эндогенно экспрессируют TIGIT человека, TIGIT суно или TIGIT мыши). В некоторых вариантах осуществления связывание антитела и перекрестную реактивность антитела определяют путем определения специфического связывания антитела к TIGIT с очищенным или рекомбинантным TIGIT (например, очищенный или рекомбинантный TIGIT человека, очищенный или рекомбинантный TIGIT суно или очищенный или рекомбинантный TIGIT мыши) или химерным белком, содержащим TIGIT (например, Fc-слитый белок, содержащий TIGIT человека, TIGIT суно или TIGIT мыши, или His-меченный белок, содержащий TIGIT человека, TIGIT суно или TIGIT мыши).

[0078] Способы анализа аффинности связывания, кинетика связывания и перекрестная реактивность известны в данной области техники. См., например, Ernst *et al.*, *Determination of Equilibrium Dissociation Constants, Therapeutic Monoclonal Antibodies* (Wiley & Sons ed. 2009). Эти способы включают, но не ограничиваются ими, твердофазные анализы связывания (например, ИФА), иммуноосаждение, поверхностный плазмонный резонанс (SPR, например, Biacore™ (GE Healthcare, Пискатауэй, Нью-Джерси)), анализы кинетического исключения (например, KinExA®), проточную цитометрию, сортировку флуоресцентно-активированных клеток (FACS), биослойную интерферометрию (например, Octet™ (FortéBio, Inc., Менло-Парк, Калифорния)) и Вестерн-блот анализ. Методы SPR рассматриваются, например, в Hahnfeld *et al.* *Determination of Kinetic Data Using SPR Biosensors, Molecular Diagnosis of Infectious Diseases* (2004). В типичном эксперименте SPR один интерактант (мишень или нацеливающий агент) иммобилизован на SPR-активном стеклянном предметном стекле с золотым покрытием в проточной ячейке, и образец, содержащий другой интерактант, вводится, чтобы он протекал над поверхностью. В случае, если свет данной длины волны попадает на поверхность, изменения оптической отражательной способности золота указывают на связывание и кинетику связывания. В некоторых вариантах осуществления для определения сродства используются анализы кинетического исключения. Этот способ описан, например, в Darling *et al.*, *Assay and Drug Development Technologies Vol. 2, number 6* 647-657 (2004). В некоторых вариантах осуществления для определения аффинности используется биослойная интерферометрия. Этот способ описан, например, в Wilson *et al.*, *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 38:400-407 (2010); Dysinger *et al.*,

*J. Immunol. Methods*, 379:30–41 (2012).

[0079] В некоторых вариантах осуществления антитела к TIGIT и их антигенсвязывающие части согласно настоящему документу ингибируют взаимодействие между TIGIT и лигандом CD155. В некоторых вариантах осуществления антитела к TIGIT и их антигенсвязывающие части ингибируют взаимодействие между TIGIT и лигандом CD112. В некоторых вариантах осуществления антитела к TIGIT и их антигенсвязывающие части ингибируют взаимодействие между TIGIT и обоими лигандами CD155 и CD112.

[0080] В некоторых вариантах осуществления способность антитела к TIGIT на ингибирование взаимодействия между TIGIT и CD155, и/или CD112 оценивали путем измерения либо физического взаимодействия между TIGIT и CD155, или уменьшения CD112 в анализе связывания. В некоторых вариантах осуществления анализ связывания представляет собой конкурентно-связывающий анализ. Анализ может проводиться в различных форматах, таких как, но не ограничиваясь этим, ИФА, проточная цитометрия, анализ поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (например, Biacore™) или биослойная интерферометрия (например, ForteBio Octet™). См., например, Duff et al., *Biochem J.*, 2009, 419:577–584; Dysinger et al., *J. Immunol. Methods*, 379:30–41 (2012); и Estep et al., *Mabs*, 2013, 5:270–278.

[0081] В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT ингибирует взаимодействие между TIGIT и CD155 в функциональном биоанализе, например, оценке функционального состояния клеток, в котором ингибирование взаимодействия TIGIT/CD155 оценивается путем измерения активации передачи сигнала CD155–CD226 в клетке (например, посредством активации нижестоящего репортера). Неограничивающий пример функционального клеточного анализа описан в разделе «Примеры» ниже. В этом типичном функциональном анализе экспрессия люциферазы требует вовлечения TCR и костимулирующего сигнала от CD155–CD226. Первая клетка (также называемая «Т-эффекторная клетка») экспрессирует комплекс TCR, TIGIT и CD226 на поверхности клетки и содержит ген люциферазы. Вторая клетка (также называемая «искусственной антигенпрезентирующей клеткой») экспрессирует активатор TCR и CD155. Совместное культивирование клеток в отсутствие антитела к TIGIT приводит к взаимодействию TIGIT–CD155, которое ингибирует костимуляцию эффекторной клетки CD155–CD226, предотвращая экспрессию люциферазы эффекторной клеткой. В присутствии

антитела к TIGIT, которое ингибирует взаимодействие между TIGIT и CD155, CD155 и CD226 способны взаимодействовать и генерировать костимулирующий сигнал, который управляет экспрессией люциферазы в первой клетке. Такие функциональные клеточные анализы описаны в данной области техники, например, Cong et al., *Genetic Engineering and Biotechnology News*, 2015, 35(10):16-17, и также являются коммерчески доступными (например, TIGIT/CD155 Blockade Bioassay Kit, Promega Corp., Madison, WI). В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT, которое ингибирует взаимодействие между TIGIT и CD155, повышает уровень или степень активации передачи сигналов CD155-CD226 (например, при измерении в клеточном анализе, таком как TIGIT/CD155 Blockade Bioassay Kit), на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или более по сравнению с уровнем или количеством передачи сигналов CD155-CD226 в отсутствие антитела к TIGIT. В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT, которое ингибирует взаимодействие между TIGIT и CD155, повышает уровень или степень активации передачи сигналов CD155-CD226 (например, при измерении в клеточном анализе, таком как TIGIT/CD155 Blockade Bioassay Kit) на по меньшей мере около 1,2 раза, по меньшей мере около 1,5 раза, по меньшей мере около 2 раза, по меньшей мере около 3 раза, по меньшей мере около 4 раза, по меньшей мере около 5 раз, по меньшей мере около 6 раз, по меньшей мере около 7 раз, по меньшей мере около 8 раз, по меньшей мере около 9 раз, по меньшей мере около 10 или более раз по сравнению с уровнем или количеством передачи сигналов CD155-CD226 в отсутствие антитела к TIGIT.

[0082] В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT, которое связывается с TIGIT человека (и, необязательно, обладает перекрестной реактивностью с TIGIT яванского макака и/или мыши, и/или необязательно ингибирует взаимодействие между TIGIT и CD155, и/или CD112) проявляет синергизм с анти-PD-1 агентом (например, антитело к PD-1m). В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT усиливает действие анти-PD-1 агента (например, анти-PD-1 антитела) в по меньшей мере около 1,2 раза, по меньшей мере около 1,5 раза, по меньшей мере около 2-раза, по меньшей мере около 3 раза, по меньшей мере около 4 раза, по меньшей мере около 5 раз, по меньшей мере около 6 раз,

по меньшей мере около 7 раз, по меньшей мере около 8 раз, по меньшей мере около 9 раз, по меньшей мере около 10 раз или более.

**[0083]** В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT демонстрирует синергизм с анти-PD-1 агентом (например, антитело к PD-1m) в функциональном биоанализе, например, функциональном клеточном анализе, в котором ингибирование передачи сигналов TIGIT и ингибирование передачи сигналов PD-1 оценивают путем измерения активации передачи сигналов в эффекторной клетке. Неограничивающий пример функционального клеточного анализа описан в разделе «Примеры» ниже. В этом типовом функциональном анализе первая клетка (также называемая «Т-эффекторная клетка») экспрессирует комплекс TCR, TIGIT, CD226 и PD-1 на поверхности клетки и содержит ген люциферазы. Вторая клетка (также называемая «искусственной антигенпрезентирующей клеткой») экспрессирует активатор TCR, CD155 и PD-L1. Экспрессия гена люциферазы эффекторной клеткой активируется одной или обеими (1) блокадой взаимодействия TIGIT-CD155, что позволяет взаимодействие CD155-CD226 и последующей костимуляции экспрессии люциферазы эффекторной клеткой, или (2) блокадой взаимодействия PD-1/PD-L1, тем самым ослабляя ингибирование экспрессии люциферазы эффекторной клеткой. Уровень экспрессии люциферазы в отсутствие или в присутствии антител к TIGIT и анти-PD-1 агентов, или анти-PD-L1 агентов может быть измерен и количественно определен для определения того, проявляет ли антитело к TIGIT синергизм с анти-PD-1 агентом или анти-PD-L1 агентом. Такие функциональные клеточные анализы описаны в данной области техники (например, Cong et al., *Genetic Engineering and Biotechnology News*, 2015, 35(10):16-17), и также являются коммерчески доступными (например, набор для комбинированного биоанализа PD-1/TIGIT, Promega Corp., Мэдисон, Висконсин).

**[0084]** В некоторых вариантах осуществления эффективность антитела к TIGIT, а также, будет ли антитело к TIGIT синергически ингибировать с анти-PD-1 агентом (например, антитело к PD-1m) или антитело к PD-L1m (например, антитело к PD-L1m) может быть измерена с использованием модели *in vivo*, например модели опухоли *in vivo*. Например, может быть оценена эффективность антитела к TIGIT, как описано в данном документе, или эффективность антитела к TIGIT, как описано в данном документе, при введении в комбинации с анти-PD-1 агентом или

анти-PD-L1 агентом с использованием модели сингенной опухоли модели мыши. Подходящие сингенные модели опухоли описаны в данной области техники. См., например, Rios-Doria et al., *Neoplasia*, 2015, 17:661-670; и Moynihan et al., *Nature Medicine*, 2016, doi:10.1038/nm.4200. В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT уменьшает размер опухоли или общее количество опухолей в модели *in vivo* по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или более по сравнению с контрольным или референтным значением (например, по сравнению с размером опухоли или общим количеством опухолей в необработанном контроле).

[0085] В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT распознает эпитоп TIGIT человека, который содержит одно или оба из аминокислотных положений 81 и 82, пронумерованные со ссылкой на SEQ ID NO: 218. В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT распознает эпитоп, который содержит Phe в положении 81. В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT распознает эпитоп, который содержит Lys или Ser в положении 82. В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT распознает эпитоп, который содержит Phe в положении 81 и Lys в положении 82. В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT распознает эпитоп, который содержит Phe в положении 81 и Ser в положении 82.

[0086] В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT распознает линейный эпитоп, который содержит одно или оба аминокислотных положений 81 и 82 (например, прерывистый эпитоп, который включает Phe в положении 81 и Lys или Ser в положении 82). В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT распознает прерывистый эпитоп, который содержит одно или оба аминокислотных положений 81 и 82 (например, прерывистый эпитоп, который содержит Phe в положении 81 и Lys или Ser в положении 82).

[0087] В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT связывается с эпитопом TIGIT человека, который дополнительно содержит одно или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15 или более) аминокислотных положений 51, 52, 53, 54, 55, 73, 74, 75, 76, 77, 79, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92 или 93. В некоторых вариантах осуществления антитело

к TIGIT связывается с эпитопом TIGIT человека, который дополнительно содержит одно или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15 или более) из следующего: Thr в положении 51, Ala в положении 52, Glu или Gln в положении 53, Val в положении 54, Thr в положении 55, Leu в положении 73, Gly в положении 74, Trp в положении 75, His в положении 76, Val или Ile в положении 77, Ser или Pro в положении 79, Asp в положении 83, Arg в положении 84, Val в положении 85, Val или Ala в положении 86, Pro в положении 87, Gly в положении 88, Pro в положении 89, Ser или Gly в положении 90, Leu в положении 91, Gly в положении 92 или Leu в положении 93. В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT связывается с эпитопом TIGIT человека, который дополнительно содержит один или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14 15 или более) аминокислотных остатков Thr51, Ala52, Gln53, Val54, Thr55, Leu73, Gly74, Trp75, His76, Ile77, Pro79, Asp83, Arg84, Val85, Ala86, Pro87, Gly88, Pro89, Gly90, Leu91, Gly92 и Leu93.

**[0088]** В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT распознает эпитоп, который содержит Phe в положении 81 и Lys или Ser в положении 82, и дополнительно содержит Thr в положении 51, Ala в положении 52, Glu или Gln в положении 53, Val в положении 54 и/или Thr в положении 55. В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT распознает эпитоп, который содержит Phe в положении 81 и Lys или Ser в положении 82, и дополнительно содержит Gly в положении 74, Trp в положении 75, His в положении 76 и/или Val или Ile в положении 77. В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT распознает эпитоп, который содержит Phe в положении 81 и Lys или Ser в положении 82, и дополнительно содержит Pro в положении 87, Gly в положении 88, Pro в положении 89, Ser или Gly в положении 90, Leu в положении 91, Gly в положении 92 и/или Leu в положении 93. В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT распознает эпитоп, содержащий аминокислотные остатки Thr51, Ala52, Gln53, Val54, Thr55, Gly74, Trp75, His76, Ile77, Phe81, Lys82, Pro87, Gly88, Pro89, Gly90, Leu91, Gly92 и Leu93.

**[0089]** В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT распознает эпитоп, который содержит Phe в положении 81 и Lys или Ser в положении 82, и дополнительно содержит Ala в положении 52 и/или Glu или Gln в положении 53. В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT распознает эпитоп, который

содержит Phe в положении 81 и Lys или Ser в положении 82, и дополнительно содержит Leu в положении 73, Gly в положении 74 и/или Trp в положении 75. В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT распознает эпитоп, который содержит Phe в положении 81 и Lys или Ser в положении 82, и дополнительно содержит Asp в положении 83, Arg в положении 84, Val в положении 85 и/или Val или Ala в положении 86. В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT распознает эпитоп, содержащий аминокислотные остатки Ala52, Gln53, Leu73, Gly74, Trp75, Pro79, Phe81, Lys82, Asp83, Arg84, Val85 и Ala86.

[0090] В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT распознает эпитоп TIGIT человека, содержащий последовательность ICNADLGWHISPSFK (SEQ ID NO: 258), что соответствует остаткам 68–82 TIGIT человека (SEQ ID NO: 218). В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT распознает эпитоп TIGIT человека, состоящий из последовательности ICNADLGWHISPSFK (SEQ ID NO: 258).

#### Последовательности антител к TIGIT

[0091] В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT, которое связывается с TIGIT человека и которое необязательно проявляет перекрестную реактивность с TIGIT яванского макака и/или TIGIT мыши содержит последовательность легкой цепи, или ее часть, и/или последовательность тяжелой цепи или ее часть, полученную из любого из следующих антител, описанных в данном документе: Клон 2, Клон 2С, Клон 3, Клон 5, Клон 13, Клон 13А, Клон 13В, Клон 13С, Клон 13D, Клон 14, Клон 16, Клон 16С, Клон 16D, Клон 16Е, Клон 18, Клон 21, Клон 22, Клон 25, Клон 25А, Клон 25В, Клон 25С, Клон 25D, Клон 25Е, Клон 27 или Клон 54. Аминокислотные последовательности CDR, переменный домен легкой цепи (VL) и переменный домен тяжелой цепи (VH) антител к TIGIT Клона 2, Клона 2С, Клона 3, Клона 5, Клона 13, Клона 13А, Клона 13В, Клона 13С, Клона 13D, Клона 14, Клона 16, Клона 16С, Клона 16D, Клона 16Е, Клона 18, Клона 21, Клона 22, Клона 25, Клона 25А, Клона 25В, Клона 25С, Клона 25D, Клона 25Е, Клона 27 и Клона 54 приведены в Таблице 3 ниже.

[0092] В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности (например, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%,

по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичную последовательности) SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 245, SEQ ID NO: 246, SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 248, SEQ ID NO: 249, SEQ ID NO: 250, SEQ ID NO: 251, SEQ ID NO: 252, SEQ ID NO: 253, SEQ ID NO: 254, SEQ ID NO: 255, SEQ ID NO: 256 или SEQ ID NO: 257. В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 245, SEQ ID NO: 246, SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 248, SEQ ID NO: 249, SEQ ID NO: 250, SEQ ID NO: 251, SEQ ID NO: 252, SEQ ID NO: 253, SEQ ID NO: 254, SEQ ID NO: 255, SEQ ID NO: 256 или SEQ ID NO: 257. В некоторых вариантах осуществления последовательность VH по меньшей мере на 90% идентичная эталонной последовательности (например, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 245, SEQ ID NO: 246, SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 248, SEQ ID NO: 249, SEQ ID NO: 250, SEQ ID NO: 251, SEQ ID NO: 252, SEQ ID NO: 253, SEQ ID NO: 254, SEQ ID NO: 255, SEQ ID NO: 256 или SEQ ID NO: 257) содержит одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более замен (например, консервативные замены), вставки или делеции относительно эталонной последовательности, но сохраняет способность связываться с TIGIT человека и, необязательно, сохраняет способность блокировать связывание CD155 и/или CD112 с TIGIT.

**[0093]** В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT содержит переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична последовательности (например, на по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична последовательности) SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:118, SEQ ID

NO:136, SEQ ID NO:154, SEQ ID NO:172, SEQ ID NO:190 или SEQ ID NO:208. В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:136, SEQ ID NO:154, SEQ ID NO:172, SEQ ID NO:190 или SEQ ID NO:208. В некоторых вариантах осуществления последовательность VL, содержащая аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную эталонной последовательности (например, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:136, SEQ ID NO:154, SEQ ID NO:172, SEQ ID NO:190 или SEQ ID NO:208) содержит один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более замен (например, консервативных замен), вставок или делеций относительно эталонной последовательности, но сохраняет способность связываться с TIGIT человека и, необязательно, сохраняет способность блокировать связывание CD155 и/или CD112 с TIGIT.

[0094] В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT содержит переменный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична последовательности (например, на по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична последовательности) SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:109, SEQ ID NO:127, SEQ ID NO:145, SEQ ID NO:163, SEQ ID NO:181, SEQ ID NO:199, SEQ ID NO:245, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248, SEQ ID NO:249, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251, SEQ ID NO:252, SEQ ID NO:253, SEQ ID NO:254, SEQ ID NO:255, SEQ ID NO:256 или SEQ ID NO:257, и дополнительно содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности (например, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или при по меньшей мере 99% идентична последовательности) SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:118, SEQ ID

NO:136, SEQ ID NO:154, SEQ ID NO:172, SEQ ID NO:190 или SEQ ID NO:208. В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:109, SEQ ID NO:127, SEQ ID NO:145, SEQ ID NO:163, SEQ ID NO:181, SEQ ID NO:199, SEQ ID NO:245, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248, SEQ ID NO:249, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251, SEQ ID NO:252, SEQ ID NO:253, SEQ ID NO:254, SEQ ID NO:255, SEQ ID NO:256 или SEQ ID NO:257, и дополнительно содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:136, SEQ ID NO:154, SEQ ID NO:172, SEQ ID NO:190 или SEQ ID NO:208.

[0095] В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT содержит:

(a) VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности (например, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична последовательности) SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 245 и VL, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности (например, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична последовательности) SEQ ID NO:10;

(b) VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности (например, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична последовательности) SEQ ID NO: 19 и VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности (например, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%,







и VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности (например, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична последовательности) SEQ ID NO: 208.

**[0096]** В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT содержит:

(a) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1; и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10;

(b) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19; и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:28;

(c) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37; и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:46;

(d) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:55; и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:64;

(e) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:73; и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:82;

(f) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:91; и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:100;

(g) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:109; и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:118;

(h) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:127; и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:136;

(i) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:145; и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:154;

(j) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:163; и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:172;

(k) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:181; и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ



(у) VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:257; и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:172.

[0097] В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT содержит одну или более (например, одну, две, три, четыре, пять или более):

последовательность CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:94, SEQ ID NO:112, SEQ ID NO:130, SEQ ID NO:148, SEQ ID NO:166, SEQ ID NO:184, SEQ ID NO:202, SEQ ID NO:221, SEQ ID NO:224, SEQ ID NO:226, SEQ ID NO:231, SEQ ID NO:233, SEQ ID NO:239 или SEQ ID NO:243;

последовательность CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:114, SEQ ID NO:132, SEQ ID NO:150, SEQ ID NO:168, SEQ ID NO:186, SEQ ID NO:204, SEQ ID NO:222, SEQ ID NO:225, SEQ ID NO:227, SEQ ID NO:229, SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:234, SEQ ID NO:238 или SEQ ID NO:240;

последовательность CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:116, SEQ ID NO:134, SEQ ID NO:152, SEQ ID NO:170, SEQ ID NO:188, SEQ ID NO:206, SEQ ID NO:223, SEQ ID NO:228, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:235, SEQ ID NO:236, SEQ ID NO:237, SEQ ID NO:241, SEQ ID NO:242 или SEQ ID NO:244;

последовательность CDR1 легкой цепи, содержащую последовательность любой из SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:121, SEQ ID NO:139, SEQ ID NO:157, SEQ ID NO:175, SEQ ID NO:193 или SEQ ID NO:211;

последовательность CDR2 легкой цепи, содержащую последовательность любой из SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:87, SEQ ID NO:105, SEQ ID NO:123, SEQ ID NO:141, SEQ ID NO:159, SEQ ID NO:177, SEQ ID NO:195 или SEQ ID NO:213; и/или

последовательность CDR3 легкой цепи, содержащую последовательность любой из SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:89, SEQ ID NO:107, SEQ ID NO:125,

SEQ ID NO:143, SEQ ID NO:161, SEQ ID NO:179, SEQ ID NO:197 или SEQ ID NO:215.

**[0098]** В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT содержит последовательность CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:94, SEQ ID NO:112, SEQ ID NO:130, SEQ ID NO:148, SEQ ID NO:166, SEQ ID NO:184, SEQ ID NO:202, SEQ ID NO:221, SEQ ID NO:224, SEQ ID NO:226, SEQ ID NO:231, SEQ ID NO:233, SEQ ID NO:239 или SEQ ID NO:243; последовательность CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:114, SEQ ID NO:132, SEQ ID NO:150, SEQ ID NO:168, SEQ ID NO:186, SEQ ID NO:204, SEQ ID NO:222, SEQ ID NO:225, SEQ ID NO:227, SEQ ID NO:229, SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:234, SEQ ID NO:238 или SEQ ID NO:240; и последовательность CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:116, SEQ ID NO:134, SEQ ID NO:152, SEQ ID NO:170, SEQ ID NO:188, SEQ ID NO:206, SEQ ID NO:223, SEQ ID NO:228, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:235, SEQ ID NO:236, SEQ ID NO:237, SEQ ID NO:241, SEQ ID NO:242 или SEQ ID NO:244.

**[0099]** В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT содержит последовательность CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:121, SEQ ID NO:139, SEQ ID NO:157, SEQ ID NO:175, SEQ ID NO:193 или SEQ ID NO:211; последовательность CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:87, SEQ ID NO:105, SEQ ID NO:123, SEQ ID NO:141, SEQ ID NO:159, SEQ ID NO:177, SEQ ID NO:195 или SEQ ID NO:213; и последовательность CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:89, SEQ ID NO:107, SEQ ID NO:125, SEQ ID NO:143, SEQ ID NO:161, SEQ ID NO:179, SEQ ID NO:197 или SEQ ID NO:215.

**[0100]** В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT содержит:

- (i) последовательность CDR1 тяжелой цепи, содержащую

последовательность любой из SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:94, SEQ ID NO:112, SEQ ID NO:130, SEQ ID NO:148, SEQ ID NO:166, SEQ ID NO:184, SEQ ID NO:202, SEQ ID NO:221, SEQ ID NO:224, SEQ ID NO:226, SEQ ID NO:231, SEQ ID NO:233, SEQ ID NO:239 или SEQ ID NO:243; и

(ii) последовательность CDR2 тяжелой цепи, содержащую последовательность любой из SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:114, SEQ ID NO:132, SEQ ID NO:150, SEQ ID NO:168, SEQ ID NO:186, SEQ ID NO:204, SEQ ID NO:222, SEQ ID NO:225, SEQ ID NO:227, SEQ ID NO:229, SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:234, SEQ ID NO:238 или SEQ ID NO:240; и

(iii) последовательность CDR3 тяжелой цепи, содержащую последовательность любой из SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:116, SEQ ID NO:134, SEQ ID NO:152, SEQ ID NO:170, SEQ ID NO:188, SEQ ID NO:206, SEQ ID NO:223, SEQ ID NO:228, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:235, SEQ ID NO:236, SEQ ID NO:237, SEQ ID NO:241, SEQ ID NO:242 или SEQ ID NO:244; и

(iv) последовательность CDR1 легкой цепи, содержащую последовательность любой из SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:121, SEQ ID NO:139, SEQ ID NO:157, SEQ ID NO:175, SEQ ID NO:193 или SEQ ID NO:211; и

(v) последовательность CDR2 легкой цепи, содержащую последовательность любой из SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:87, SEQ ID NO:105, SEQ ID NO:123, SEQ ID NO:141, SEQ ID NO:159, SEQ ID NO:177, SEQ ID NO:195 или SEQ ID NO:213; и

(vi) последовательность CDR3 легкой цепи, содержащую последовательность любой из SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:89, SEQ ID NO:107, SEQ ID NO:125, SEQ ID NO:143, SEQ ID NO:161, SEQ ID NO:179, SEQ ID NO:197 или SEQ ID NO:215.

**[0101]** В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT содержит: (i) последовательность CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 221; (ii) последовательность CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 222; (iii) последовательность CDR3 тяжелой цепи, содержащую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 223; (iv) последовательность CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; (v) последовательность CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15; и (vi) последовательность CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.

**[0102]** В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT содержит: (i) последовательность CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 224 или SEQ ID NO: 226; (ii) последовательность CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 225, SEQ ID NO: 227 или SEQ ID NO: 229; (iii) последовательность CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 228 или SEQ ID NO: 230; (iv) последовательность CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67; (v) последовательность CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69; и (vi) последовательность CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71.

**[0103]** В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT содержит: (i) последовательность CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 231, или SEQ ID NO: 233; (ii) последовательность CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 232 или SEQ ID NO: 234; (iii) последовательность CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 235, SEQ ID NO: 236 или SEQ ID NO: 237; (iv) последовательность CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 103; (v) последовательность CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 105; и (vi) последовательность CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107.

**[0104]** В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT содержит: (i) последовательность CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 239, или SEQ ID NO: 243; (ii) последовательность CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность любой

из SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 238 или SEQ ID NO: 240; (iii) последовательность CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 242 или SEQ ID NO: 244; (iv) последовательность CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 175; (v) последовательность CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 177; и (vi) последовательность CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 179.

**[0105]** В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT содержит CDR1-3 тяжелую цепь и CDR1-3 легкую цепь, содержащую аминокислотные последовательности:

- (a) SEQ ID NO: 4, 6, 8, 13, 15 и 17 соответственно;
- (b) SEQ ID NO: 22, 24, 26, 31, 33 и 35 соответственно;
- (c) SEQ ID NO: 40, 42, 44, 49, 51 и 53 соответственно;
- (d) SEQ ID NO: 58, 60, 62, 67, 69 и 71 соответственно;
- (e) SEQ ID NO: 76, 78, 80, 85, 87 и 89 соответственно;
- (f) SEQ ID NO: 94, 96, 98, 103, 105 и 107 соответственно;
- (g) SEQ ID NO: 112, 114, 116, 121, 123 и 125 соответственно;
- (h) SEQ ID NO: 130, 132, 134, 139, 141 и 143 соответственно;
- (i) SEQ ID NO: 148, 150, 152, 157, 159 и 161 соответственно;
- (j) SEQ ID NO: 166, 168, 170, 175, 177 и 179 соответственно;
- (k) SEQ ID NO: 184, 186, 188, 193, 195 и 197 соответственно;
- (l) SEQ ID NO: 202, 204, 206, 211, 213 и 215 соответственно; ИЛИ
- (m) SEQ ID NO: 221, 222, 223, 13, 15 и 17 соответственно;  
ИЛИ
- (n) SEQ ID NO: 224, 225, 62, 67, 69 и 71 соответственно;  
ИЛИ
- (o) SEQ ID NO: 226, 227, 228, 67, 69 и 71 соответственно;  
ИЛИ
- (p) SEQ ID NO: 224, 229, 230, 67, 69 и 71 соответственно;  
ИЛИ
- (q) SEQ ID NO: 224, 227, 230, 67, 69 и 71 соответственно;  
ИЛИ

(r) SEQ ID NO: 231, 232, 235, 103, 105 и 107  
соответственно; или

(s) SEQ ID NO: 233, 234, 236, 103, 105 и 107  
соответственно; или

(t) SEQ ID NO: 233, 234, 237, 103, 105 и 107  
соответственно; или

(u) SEQ ID NO: 166, 238, 170, 175, 177 и 179  
соответственно; или

(v) SEQ ID NO: 239, 240, 170, 175, 177 и 179  
соответственно; или

(w) SEQ ID NO: 239, 240, 241, 175, 177 и 179  
соответственно; или

(x) SEQ ID NO: 239, 240, 242, 175, 177 и 179  
соответственно; или

(y) SEQ ID NO: 243, 168, 244, 175, 177 и 179  
соответственно.

**[0106]** В некоторых вариантах осуществления антитело дополнительно содержит каркасную область, например, каркасную область иммуноглобулина человека. Например, В некоторых вариантах осуществления антитело содержит CDR, как описано в данном документе, и дополнительно содержит акцепторную каркасную область человека, например, каркасную область иммуноглобулина человека или консенсусную каркасную область человека. Человеческие каркасные области иммуноглобулина могут быть частью человеческого антитела, или антитело, не относящегося к человеку, может быть гуманизировано путем замены одной или более эндогенных каркасных областей человеческими каркасными областями. Каркасные области человека, которые можно использовать для гуманизации, включают, но не ограничиваются ими: каркасные области, выбранные с использованием метода «наилучшего соответствия» (см., например, Sims *et al.*, *J. Immunol.* 151:2296 (1993)); каркасные области, полученные из консенсусной последовательности человеческих антител определенной подгруппы переменных областей легкой или тяжелой цепи (см., например, Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); и Presta *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); каркасные области взрослого человека (соматически мутированные) или каркасные области зародышевой линии человека (см., например, Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); и каркасные области, полученные из скрининга библиотек FR (см.,

например, *Vasa et al., J. Biol. Chem.* 272:10678–10684 (1997) и *Rosok et al., J. Biol. Chem.* 271:22611–22618 (1996)). Каркасные последовательности могут быть получены из общедоступных баз данных ДНК или опубликованных ссылок, которые включают последовательности генов антител зародышевой линии. Например, последовательности ДНК зародышевой линии для генов вариабельной области тяжелой и легкой цепей человека можно найти в базе данных вариабельных генов зародышевой линии «VBASE2» для последовательностей человека и мыши.

**[0107]** В некоторых вариантах осуществления, антитело к TIGIT содержит одну или более каркасных областей тяжелой цепи (FR1, FR2, FR3 и/или FR4), содержащих аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:81, SEQ ID NO:93, SEQ ID NO:95, SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:99, SEQ ID NO:111, SEQ ID NO:113, SEQ ID NO:115, SEQ ID NO:117, SEQ ID NO:129, SEQ ID NO:131, SEQ ID NO:133, SEQ ID NO:135, SEQ ID NO:147, SEQ ID NO:149, SEQ ID NO:151, SEQ ID NO:153, SEQ ID NO:165, SEQ ID NO:167, SEQ ID NO:169, SEQ ID NO:171, SEQ ID NO:183, SEQ ID NO:185, SEQ ID NO:187, SEQ ID NO:189, SEQ ID NO:201, SEQ ID NO:203, SEQ ID NO:205 или SEQ ID NO:207.

**[0108]** В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT содержит одну или более каркасных областей легкой цепи (FR1, FR2, FR3 и/или FR4), содержащих аминокислотную последовательность SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:84, SEQ ID NO:86, SEQ ID NO:88, SEQ ID NO:90, SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:106, SEQ ID NO:108, SEQ ID NO:120, SEQ ID NO:122, SEQ ID NO:124, SEQ ID NO:126, SEQ ID NO:138, SEQ ID NO:140, SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:144, SEQ ID NO:156, SEQ ID NO:158, SEQ ID NO:160, SEQ ID NO:162, SEQ ID NO:174, SEQ ID NO:176, SEQ ID NO:178, SEQ ID NO:180, SEQ ID NO:192, SEQ ID NO:194, SEQ ID NO:196, SEQ ID NO:198, SEQ ID NO:210, SEQ ID NO:212, SEQ ID NO:214 или SEQ ID NO:216.

**[0109]** В некоторых вариантах осуществления антитела к TIGIT

согласно настоящему изобретению не конкурируют за связывание с антителами, описанными в патенте США 2009/0258013, США 2016/0176963, США 2016/0376365 или WO 2016/028656. В некоторых вариантах осуществления антитела к TIGIT согласно настоящему изобретению не связываются с тем же эпитопом, что и антитела, описанные в публикациях США 2009/0258013, США 2016/0176963, США 2016/0376365 или WO 2016/028656.

#### Получение антител

[0110] Для получения антител связывающихся с TIGIT может быть использовано множество способов известных в данной области техники. См., например, Kohler & Milstein, *Nature* 256:495-497 (1975); Kozbor et al., *Immunology Today* 4: 72 (1983); Cole et al., pp. 77-96 в *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. (1985); Coligan, *Current Protocols in Immunology* (1991); Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (1988); и Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2nd ed. 1986)).

[0111] Гены, кодирующие тяжелые и легкие цепи представляющего интерес антитела, могут быть клонированы из клетки, например, гены, кодирующие моноклональное антитело, могут быть клонированы из гибридомы и использованы для получения рекомбинантного моноклонального антитела. Генные библиотеки, кодирующие тяжелые и легкие цепи моноклональных антител, также могут быть получены из гибридомных или плазматических клеток. Кроме того, технология фагового или дрожжевого дисплея может быть использована для идентификации антител и гетеромерных фрагментов Fab, которые специфически связываются с выбранными антигенами (см., например, McCafferty et al., *Nature* 348:552-554 (1990); Marks et al., *Biotechnology* 10:779-783 (1992); Lou et al. (2010) *PEDS* 23:311; и Chao et al., *Nature Protocols*, 1:755-768 (2006)). Альтернативно, антитела и последовательности антител могут быть выделены и/или идентифицированы с использованием системы презентации антител на основе дрожжей, такой как система, раскрытая, например, в Xu et al., *Protein Eng Des Sel*, 2013, 26:663-670; WO 2009/036379; WO 2010/105256; и WO 2012/009568. Случайные комбинации генных продуктов тяжелой и легкой цепей генерируют большой пул антител с различной антигенной специфичностью (см., например, Kubu, *Immunology* (3<sup>rd</sup> ed. 1997)). Способы получения одноцепочечных антител или рекомбинантных антител (патент США № 4946778, патент США №

4816567) также могут быть адаптированы для получения антител. Антитела также могут быть сделаны биспецифичными, то есть способными распознавать два разных антигена (см., например, WO 93/08829, Traunecker et al., *EMBO J.* 10:3655-3659 (1991); и Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121:210 (1986)). Антитела также могут быть гетероконъюгатами, например, двумя ковалентно связанными антителами или антителами, ковалентно связанными с иммунотоксинами (см., например, патент США № 4676980, WO 91/00360; и WO 92/200373).

[0112] Антитела могут быть получены с использованием любого числа систем экспрессии, включая прокариотические и эукариотические системы экспрессии. В некоторых вариантах осуществления система экспрессии представляет собой клетку млекопитающего, такую как гибридома, или клетка CHO. Многие такие системы широко доступны у коммерческих поставщиков. В вариантах осуществления, в которых антитело содержит как область  $V_H$ , так и область  $V_L$ , области  $V_H$  и  $V_L$  могут быть экспрессированы с использованием одного вектора, например, в дицистронной экспрессионной единице, или находиться под контролем различных промоторов. В других вариантах осуществления области  $V_H$  и  $V_L$  могут быть экспрессированы с использованием отдельных векторов. Области  $V_H$  или  $V_L$ , как описано в данном документе, могут необязательно содержать метионин на N-конце.

[0113] Способы гуманизации или приматизации нечеловеческих антител также известны в данной области техники. Как правило, гуманизованное антитело имеет один или более аминокислотных остатков, введенных в него из источника, который не является человеком. Таковые нечеловеческие аминокислотные остатки часто называют импортными остатками, которые обычно берут из импортного переменного домена. По существу, гуманизация может быть выполнена по способу Винтера и его коллег (см., например, Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science* 239:1534-1536 (1988) и Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992)) путем замены CDR или последовательностей CDR грызунов соответствующими последовательностями человеческого антитела. Такими гуманизованными антителами являются химерные антитела (патент США № 4816567), где существенно меньше, чем интактный человеческий переменный домен, был замещен соответствующей последовательностью из нечеловеческого вида. На практике

гуманизированные антитела обычно представляют собой антитела человека, в которых некоторые остатки CDR и, возможно, некоторые остатки FR замещены остатками из аналогичных сайтов в антителах грызунов. Трансгенных мышей или других организмов, таких как другие млекопитающие, можно использовать для экспрессии гуманизированных или человеческих антител (см., например, патенты США № 5545807; 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; 5661016, Marks *et al.*, *Bio/Technology* 10:779-783 (1992); Lonberg *et al.*, *Nature* 368:856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368:812-13 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnology* 14:845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14:826 (1996); и Lonberg & Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995)).

[0114] В качестве альтернативы гуманизации могут быть получены человеческие антитела. В качестве неограничивающего примера могут быть получены трансгенные животные (например, мыши), которые способны после иммунизации производить полный репертуар человеческих антител в отсутствие выработки эндогенного иммуноглобулина. Например, было описано, что гомозиготная делеция гена области присоединения тяжелой цепи антитела (JH) у химерных и мутантных мышей зародышевой линии приводит к полному ингибированию продукции эндогенных антител. Перенос массива генов человеческого иммуноглобулина зародышевой линии у таких мышей-мутантов зародышевой линии приведет к выработке человеческих антител при заражении антигеном. См., например, Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, *Year in Immun.*, 7:33 (1993); и патенты США № 5591669, 5589369 и 5545807.

[0115] В некоторых вариантах осуществления генерируются фрагменты антител (такие как Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, scFv или диатело). Были разработаны различные способы для производства фрагментов антител. Традиционно данные фрагменты были получены путем протеолитического расщепления интактных антител (см., например, Morimoto *et al.*, *J. Biochem. Biophys. Meth.*, 24:107-117 (1992); и Brennan *et al.*, *Science*, 229:81 (1985)). Однако таковые фрагменты теперь могут быть получены непосредственно с использованием рекомбинантных клеток-хозяев. Например, фрагменты антител могут быть выделены из фаговых библиотек антител. Альтернативно, фрагменты Fab'-SH могут быть непосредственно извлечены из клеток *E.coli* и химически связаны с образованием

фрагментов F(ab')<sub>2</sub> (см., например, Carter *et al.*, *BioTechnology*, 10: 163–167 (1992)). Согласно другому подходу, фрагменты F(ab')<sub>2</sub> могут быть выделены непосредственно из культуры рекомбинантных клеток-хозяев. Другие способы получения фрагментов антител будут очевидны для специалистов в данной области техники. В других вариантах осуществления выбранное антитело представляет собой одноцепочечный фрагмент Fv (scFv). См., например, публикацию РСТ № WO 93/16185; и патенты США № 5571894 и 5587458. Фрагмент антитела также может представлять собой линейное антитело, как описано, например, в патенте США № 5641870.

[0116] В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела могут быть конъюгированы с другой молекулой, например полиэтиленгликолем (ПЭГилирование) или сывороточным альбумином, для обеспечения увеличенного периода полужизни *in vivo*. Примеры ПЭГилирования фрагментов антител приведены в Knight *et al.* *Platelets* 15:409, 2004 (для абсиксимаба); Pedley *et al.*, *Br. J. Cancer* 70:1126, 1994 (для анти-СЕА антитела); Chapman *et al.*, *Nature Biotech.* 17:780, 1999; и Humphreys, *et al.*, *Protein Eng. Des.* 20: 227, 2007).

[0117] В некоторых вариантах осуществления предложены мультиспецифические антитела, содержащие антитело к TIGIT или антигенсвязывающий фрагмент, как описано в данном документе, например, биспецифическое антитело. Мультиспецифичные антитела представляют собой антитела, которые имеют специфичность связывания по меньшей мере по отношению к двум разным сайтам. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическое антитело обладает специфичностью связывания по отношению к TIGIT (например, TIGIT человека) и обладает специфичностью связывания по меньшей мере по отношению к одному другому антигену. Способы получения полиспецифических антител включают, но не ограничиваются ими, рекомбинантную коэкспрессию двух пар тяжелой цепи и легкой цепи в клетке-хозяине (см., например, Zuo *et al.*, *Protein Eng Des Sel*, 2000, 13:361–367); инженерию «выступ-во-впадину» (см., например, Ridgway *et al.*, *Protein Eng Des Sel*, 1996, 9:617–721); технологию "диатела" (см., например, Hollinger *et al.*, *PNAS (USA)*, 1993, 90:6444–6448); и внутримолекулярную тримеризацию (см., например, Alvarez-Cienfuegos *et al.*, *Scientific Reports*, 2016, doi:/10.1038/srep28643); см. также Spiess *et al.*, *Molecular Immunology*, 2015, 67(2), Part A:95–106.

[0118] В некоторых вариантах осуществления предложены

конъюгаты антитело-лекарственное средство, содержащие антитело к TIGIT или антигенсвязывающий фрагмент, как описано в данном документе. В конъюгатах антитело-лекарственное средство моноклональное антитело, обладающее специфичностью связывания с антигеном (например, TIGIT), ковалентно связано с цитотоксическим лекарственным средством. Способы получения конъюгатов антитело-лекарственное средство описаны, например, в Chudasama et al., *Nature Chemistry*, 2016, 8:114-119; WO 2013/068874; и патенте США 8535678.

Молекулы нуклеиновых кислот, векторы экспрессии и клетки-хозяева

[0119] В некоторых вариантах осуществления антитела к TIGIT, как описано в данном документе, получают с использованием рекомбинантных способов. Соответственно, в некоторых аспектах изобретение относится к выделенным нуклеиновым кислотам, содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую любое из антител к TIGIT, как описано в данном документе (например, любую одну или более CDR, описанных в данном документе); векторам, содержащим такие нуклеиновые кислоты; и клеткам-хозяевам, в которые вводятся нуклеиновые кислоты, которые используются для репликации кодирующих антитело нуклеиновых кислот и/или для экспрессии антител. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин является эукариотической, например, клеткой яичника китайского хомячка (CHO); или человеческой клеткой.

[0120] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид (например, выделенный полинуклеотид) содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело или его антигенсвязывающую часть, как описано в данном документе (например, как описано в разделе выше, озаглавленном «Последовательности антител к TIGIT»). В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую одну или более аминокислотных последовательностей (например, CDR, области тяжелой цепи, легкой цепи и/или каркаса), раскрытых в Таблице 3 ниже. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 85% (например, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей

мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную последовательности) идентичную последовательности (например, последовательности CDR, тяжелой цепи, легкой цепи или каркасной области) раскрытой в Таблице 3 ниже.

[0121] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид (например, выделенный полинуклеотид) содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:109, SEQ ID NO:127, SEQ ID NO:145, SEQ ID NO:163, SEQ ID NO:181, SEQ ID NO:199, SEQ ID NO:245, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248, SEQ ID NO:249, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251, SEQ ID NO:252, SEQ ID NO:253, SEQ ID NO:254, SEQ ID NO:255, SEQ ID NO:256 или SEQ ID NO:257. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:92, SEQ ID NO:110, SEQ ID NO:128, SEQ ID NO:146, SEQ ID NO:164, SEQ ID NO:182 или SEQ ID NO:200.

[0122] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид (например, выделенный полинуклеотид) содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область легкой цепи, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:136, SEQ ID NO:154, SEQ ID NO:172, SEQ ID NO:190 или SEQ ID NO:208. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:119, SEQ ID NO:137, SEQ ID NO:155, SEQ ID NO:173, SEQ ID NO:191 или SEQ ID NO:209.

[0123] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид

содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:109, SEQ ID NO:127, SEQ ID NO:145, SEQ ID NO:163, SEQ ID NO:181, SEQ ID NO:199, SEQ ID NO:245, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248, SEQ ID NO:249, SEQ ID NO:250, SEQ ID NO:251, SEQ ID NO:252, SEQ ID NO:253, SEQ ID NO:254, SEQ ID NO:255, SEQ ID NO:256 или SEQ ID NO:257 и кодирующую переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:136, SEQ ID NO:154, SEQ ID NO:172, SEQ ID NO:190 или SEQ ID NO:208. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:92, SEQ ID NO:110, SEQ ID NO:128, SEQ ID NO:146, SEQ ID NO:164, SEQ ID NO:182 или SEQ ID NO:200 и дополнительно содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:119, SEQ ID NO:137, SEQ ID NO:155, SEQ ID NO:173, SEQ ID NO:191 или SEQ ID NO:209.

**[0124]** В дополнительном аспекте предлагаются способы получения антитела к TIGIT, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления способ включает культивирование клетки-хозяина, как описано в данном документе (например, клетки-хозяина, экспрессирующей полинуклеотид или вектор, как описано в данном документе), в условиях, подходящих для экспрессии антитела. В некоторых вариантах осуществления антитело впоследствии выделяют из клетки-хозяина (или культуральной среды клетки-хозяина).

**[0125]** Подходящие векторы, содержащие полинуклеотиды, кодирующие антитела по настоящему изобретению, или их фрагменты, включают векторы клонирования и векторы экспрессии. Хотя выбранный вектор клонирования может варьироваться в зависимости

от клетки-хозяина, предназначенной для использования, полезные векторы клонирования, как правило, обладают способностью к саморепликации, могут иметь одну мишень для конкретной рестрикционной эндонуклеазы и/или могут нести гены для маркера, который может быть использован при отборе клонов, содержащих вектор. Примеры включают плазмиды и бактериальные вирусы, например pUC18, pUC19, Bluescript (например, pBS SK +) и его производные, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, ДНК фага и челночные векторы, такие как pSA3 и pAT28. Векторы клонирования доступны от коммерческих поставщиков, таких как BioRad, Stratagene и Invitrogen.

[0126] Векторы экспрессии, как правило, представляют собой реплицируемые полинуклеотидные конструкции, которые содержат нуклеиновую кислоту по данному изобретению. Вектор экспрессии может реплицироваться в клетках-хозяевах либо в виде эписом, либо в качестве неотъемлемой части хромосомной ДНК. Подходящие векторы экспрессии включают, но не ограничиваются ими, плазмиды, вирусные векторы, включая аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, ретровирусы и любой другой вектор.

#### **IV. ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АНТИТЕЛ К TIGIT.**

[0127] В другом аспекте предлагаются способы лечения или профилактики рака у субъекта. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту терапевтического количества антитела к TIGIT или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано в данном документе, или фармацевтической композиции, содержащей антитело к TIGIT или антигенсвязывающий фрагмент, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека, например, взрослого человека или ребенка.

[0128] В некоторых вариантах раком является рак или раковая клетка, которая имеет повышенную экспрессию CD112 и/или CD155. В некоторых вариантах осуществления рак, который имеет повышенную экспрессию CD112 и/или CD155, идентифицируют иммуногистохимической оценкой образцов опухоли с использованием антител, специфичных к CD112 или CD155. В некоторых вариантах осуществления экспрессия CD112 или CD155 повышена или увеличена в опухолевых клетках или в инфильтрирующих опухоль лейкоцитах. В некоторых вариантах осуществления рак идентифицируют на основании оценки уровней мРНК CD112 и/или CD155 в образцах

опухоли (например, способами, известными в данной области техники, такими как количественная ОТ-ПЦР). В некоторых вариантах осуществления измерения уровней растворимого CD112 или CD155 в образцах крови, полученных от больных раком, можно использовать для идентификации рака, который имеет повышенную экспрессию CD112 и/или CD155. В некоторых вариантах осуществления способ включает получение образца от субъекта (например, образца опухоли или образца крови), измерение уровня CD112 и/или CD155 в образце от субъекта и сравнение уровня CD112 и/или CD155 в образце от субъекта с контрольным значением (например, образец от здорового контрольного субъекта или уровень экспрессии CD112 и/или CD155, определенный для популяции здоровых контролей). В некоторых вариантах осуществления способ включает определение того, что уровень CD112 и/или CD155 в образце от субъекта является выше контрольного значения, и последующее введение субъекту антитела к TIGIT, как описано в данном документе.

[0129] В некоторых вариантах осуществления раком является рак или раковая клетка, которые имеют повышенное количество Т-клеток или натуральных киллеров (NK), которые экспрессируют TIGIT. В некоторых вариантах осуществления рак, который имеет повышенную экспрессию TIGIT, идентифицируют иммуногистохимической оценкой образцов опухоли с использованием антител, специфичных к TIGIT. В некоторых вариантах осуществления антитело, которое является специфичным для Т-клеток или NK-клеток (например, анти-CD3, анти-CD4, анти-CD8, анти-CD25 или анти-CD56), используют для определения подмножества или подмножеств инфильтрирующих опухоль клеток, которые экспрессируют TIGIT. В некоторых вариантах осуществления рак идентифицируют на основании оценки уровней мРНК TIGIT в образцах опухоли. В некоторых вариантах осуществления измерения уровня растворимого TIGIT в образцах крови, полученных от онкологических пациентов, могут использоваться (необязательно в комбинации с антителом, специфичным для Т-клеток или NK-клеток), чтобы идентифицировать рак, который имеет повышенное количество Т-клеток или NK-клеток, которые экспрессируют TIGIT. В некоторых вариантах осуществления способ включает получение образца от субъекта (например, образца опухоли или образца крови), измерение уровня TIGIT в образце от субъекта, опциональное обнаружение присутствия Т-клеток или NK-клеток (например, с

использованием антитела, которое является специфичным для Т-клеток или NK-клеток, таких как анти-CD3, анти-CD4, анти-CD8, анти-CD25 или анти-CD56), и сравнение уровня TIGIT в образце от субъекта с контрольным значением (например, образец от здорового контрольного субъекта или уровень экспрессии TIGIT, определенный для популяции здоровых контролей). В некоторых вариантах осуществления способ включает определение того, что уровень TIGIT в образце от субъекта является выше контрольного значения, и последующее введение субъекту антител к TIGIT, как описано в данном документе.

[0130] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак матки, рак шейки матки, рак яичника, рак простаты, рак яичка, рак пищевода, рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак толстой кишки, рак почки, рак головы и шеи, рак легких, рак желудка, рак половых клеток, рак кости, рак печени, рак щитовидной железы, рак кожи (например, меланомы), новообразование центральной нервной системы, лимфома, лейкоз, миелома или саркома. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак желудка. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак легких. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак кожи (например, меланому). В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой метастатический рак. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой лимфому или лейкоз, включая, но не ограничиваясь ими, острый миелоидный, хронический миелоидный, острый лимфоцитарный или хронический лимфолейкоз, диффузную крупную В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, лимфому мантийных клеток, малую лимфоцитарную лимфому, первичную медиастинальную В-крупноклеточную лимфому, В-клеточную лимфому маргинальной зоны селезенки или В-клеточную лимфому экстранодальной маргинальной зоны.

[0131] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту терапевтического количества иммуноонкологического агента. В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологический агент представляет собой агент (например, антитело, малую молекулу или пептид), который противодействует или ингибирует компонент пути иммунной контрольной точки, например, пути PD-1, пути CTLA-4, пути Lag3 или пути TIM-3. В некоторых вариантах осуществления

иммуноонкологический агент представляет собой агонист коактиватора Т-клеток (то есть агонист белка, который стимулирует активацию Т-клеток) нацеленный на путь OX-40, путь 4-1BB (CD137), путь CD27, путь ICOS или путь GITR.

**[0132]** В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологический агент представляет собой ингибитор пути PD-1. В некоторых вариантах осуществления ингибитор пути PD-1 представляет собой антитело к PD-1 или антитело к PD-L1, такое как, но не ограничиваясь ими, пембролизумаб, ниволумаб, дурвалумаб, пидилизумаб или атезолизумаб. Ингибиторы пути PD-1 описаны в данной области техники. См., например, Dolan et al., *Cancer Control*, 2014, 21:231-237; Luke et al., *Oncotarget*, 2014, 6:3479-3492; США 2016/0222113; США 2016/0272708; США 2016/0272712; и США 2016/0319019.

**[0133]** В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологический агент представляет собой агонист коактиватора Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологический агент представляет собой агонист CD28, CD28H, CD3, 4-1BB (CD137), ICOS, OX40, GITR, CD27 или CD40. В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологический агент представляет собой иммуностимулирующий цитокин. В некоторых вариантах осуществления иммуностимулирующий цитокин представляет собой гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), интерлейкин 1 (IL-1), интерлейкин 2 (IL-2), интерлейкин 3 (IL-3), интерлейкин 12 (IL-12), интерлейкин 15 (IL-15) или гамма-интерферон (IFN- $\gamma$ ).

**[0134]** В некоторых вариантах осуществления лечение антителом к TIGIT, как описано в данном документе, комбинируют с одним или более другими способами лечения рака, такими как хирургическое вмешательство, облучение или химиотерапия. В некоторых вариантах осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой алкилирующий агент (например, циклофосфамид, ифосфамид, хлорамбуцил, бусульфан, мелфалан, мехлорэтамин, урамустин, тиотепа, нитрозомочевину или темозоломид), антрациклин (например, доксорубицин, адриаамин, даунорубицин, эпирубицин или митоксантрон), разрушитель цитоскелета (например, паклитаксел или доцетаксел), ингибитор гистондеацетилазы (например, вориностат или ромидеписин), ингибитор топоизомеразы

(например, иринотекан, топотекан, амсакрин, этопозид или тенипозид), ингибитор киназы (бортезомиб, эрлотиниб, гефитиниб, иматиниб, вемурафениб или висмодегиб), нуклеозидный аналог или аналог предшественник нуклеозида (например, азацитидин, азатиоприн, капецитабин, цитарабин, фторурацил, гемцитабин, гидроксимочевина, меркаптопурин, метотрексат или тиогуанин), пептидный антибиотик (например, актиномицин или блеомицин), средство на основе платины (например, цисплатин, оксалоплатин или карбоплатин) или растительный алкалоид (например, винкристин, винбластин, винорэльбин, виндезин, подофиллотоксин, паклитаксел или доцетаксел).

[0135] В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT (и, необязательно, иммуноонкологический агент или другое терапевтическое лечение) вводят в терапевтически эффективном количестве или дозе. Диапазон суточной дозы, который может быть использован составляет от около 0,01 мг/кг до около 500 мг/кг, или от около 0,1 мг/кг до около 200 мг/кг, или от около 1 мг/кг до около 100 мг/кг, или от около 10 мг/кг до около 50 мг/кг. Однако дозировки могут варьироваться в зависимости от нескольких факторов, включая выбранный путь введения, состав композиции, реакцию пациента, тяжесть состояния, вес субъекта и мнение врача, назначающего препарат. Дозировка может быть увеличена или уменьшена с течением времени, как того требует отдельный пациент. В определенных случаях пациенту сначала вводят низкую дозу, которая затем увеличивается до эффективной дозировки, приемлемой для пациента. Определение эффективного количества находится в пределах компетенции специалистов в данной области техники.

[0136] Способ введения антитела к TIGIT или фармацевтической композиции, содержащей антитело к TIGIT (и, необязательно иммуноонкологический агент или другое терапевтическое лечение), может быть пероральным, внутривенным, транскутaneous, подкожным, внутривенным, внутримышечным, ингаляционным местным, интравенным, ректальным, интрабронхиальным, назальным, трансмукозальным, кишечным, глазным или ушным или любым другим способом, известным в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT (и, необязательно иммуноонкологический агент) вводят перорально, внутривенно или внутривенно.

[0137] Совместно вводимые терапевтические агенты (например,

антитело к TIGIT и иммуноонкологический агент или другое терапевтическое лечение) можно вводить вместе или по отдельности, одновременно или в разное время. При введении, терапевтические агенты могут независимо вводиться один, два, три, четыре раза в день или более или менее часто, по мере необходимости. В некоторых вариантах осуществления вводимые терапевтические агенты вводят один раз в день. В некоторых вариантах осуществления вводимые терапевтические агенты вводят в одно и то же время, например, в виде смеси. В некоторых вариантах осуществления один или более терапевтических агентов вводят в составе с замедленным высвобождением.

[0138] В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT и другое терапевтическое лечение (например, иммуноонкологический агент) вводят одновременно. В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT и другое терапевтическое лечение (например, иммуноонкологический агент) вводят последовательно. Например, в некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT вводят первым, например, в течение около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 дней или более до введения иммуноонкологического средства. В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологический агент вводят первым, например, в течение около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 дней или более до введения антитела к TIGIT.

[0139] В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT (и, необязательно, иммуноонкологический агент) вводят субъекту в течение продолжительного периода времени, например, в течение, по меньшей мере 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350 дней или дольше.

## **V. КОМПОЗИЦИИ И НАБОРЫ**

[0140] В другом аспекте предложены композиции и наборы, содержащие антитело к TIGIT, для применения при лечении или профилактике рака у субъекта.

### **Фармацевтические композиции**

[0141] В некоторых вариантах осуществления предлагаются фармацевтические композиции, содержащие антитело к TIGIT, для применения при введении субъекту, страдающему раком. В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT является таким, как описано в разделе III выше, например, антитело к TIGIT, обладающее аффинностью, активностью, перекрестной реактивностью,

распознаванием эпитопа и/или одной или более CDR, VH и/или VL последовательностями, как описано в разделе III выше.

[0142] В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT и иммуноонкологический агент (например, ингибитор пути PD-1, как описано в данном документе) включают в фармацевтические композиции вместе или по отдельности, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологический агент представляет собой ингибитор пути PD-1 или ингибитор пути CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологический агент представляет собой агонист коактиватора T-клеток. В некоторых вариантах осуществления ингибитор пути PD-1 представляет собой антитело к PD-1 или антитело к PD-L1, такое как, но не ограничиваясь ими, пембролизумаб, ниволумаб, дурвалумаб, пидилизумаб или атезолизумаб.

[0143] Руководство по приготовлению составов для применения в данном изобретении можно найти, например, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 21<sup>st</sup> Ed., 2006, *supra*; *Martindale: The Complete Drug Reference*, Sweetman, 2005, London: Pharmaceutical Press; *Niazi, Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations*, 2004, CRC Press; and *Gibson, Pharmaceutical Preformulation and Formulation: A Practical Guide from Candidate Drug Selection to Commercial Dosage Form*, 2001, Interpharm Press, которые настоящим включены в данный документ посредством ссылки. Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, могут быть получены способом, который известен специалистам в данной области техники, то есть посредством обычных способов смешивания, растворения, гранулирования, приготовления драже, эмульгирования, инкапсулирования, захвата или лиофилизации. Следующие способы и наполнители являются просто примерными и никоим образом не ограничивают данное изобретение.

[0144] В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT (и, необязательно, иммуноонкологический агент) готовят для доставки в составе с замедленным высвобождением, контролируемым высвобождением, пролонгированным высвобождением, времяконтролируемым высвобождением или с отсроченным высвобождением, например, в полупроницаемых матрицах твердых гидрофобных полимеров, содержащих терапевтический агент. Были созданы и хорошо известны специалистам в данной области техники

различные типы материалов с замедленным высвобождением. Современные составы с пролонгированным высвобождением включают таблетки с пленочным покрытием, системы из множества частиц или гранул, матричные технологии с использованием гидрофильных или липофильных материалов и таблетки на основе воска с порообразующими наполнителями (см., например, Huang, et al. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 29:79 (2003); Pearnchob, et al. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 29:925 (2003); Maggi, et al. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 55:99 (2003); Khanvilkar, et al., *Drug Dev. Ind. Pharm.* 228:601 (2002); и Schmidt, et al., *Int. J. Pharm.* 216:9 (2001)). Системы доставки с замедленным высвобождением могут, в зависимости от их конструкции, высвобождать соединения в течение часов или дней, например, в течение 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24 часов или более. Обычно составы с замедленным высвобождением могут быть получены с использованием природных или синтетических полимеров, например, полимерных винилпирролидонов, таких как поливинилпирролидон (PVP); карбоксивинилгидрофильных полимеров; гидрофобных и/или гидрофильных гидроколлоидов, такие как метилцеллюлоза, этилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза и гидроксипропилметилцеллюлоза; и карбоксиполиметилен.

[0145] Для перорального введения можно составить антитело к TIGIT (и, необязательно, иммуноонкологический агент), комбинируя его с фармацевтически приемлемыми носителями, которые хорошо известны в данной области техники. Такие носители позволяют составлять соединения в виде таблеток, пилюль, драже, капсул, эмульсий, липофильных и гидрофильных суспензий, жидкостей, гелей, сиропов, суспензий, суспензий и тому подобного для перорального приема пациентом, подлежащим лечению. Фармацевтические препараты для перорального применения могут быть получены путем смешивания соединений с твердым вспомогательным веществом, необязательного измельчения полученной смеси и обработки смеси гранул после добавления подходящих вспомогательных веществ, если желательно, для получения ядер таблеток или драже. Подходящие вспомогательные вещества включают, например, наполнители, такие как сахара, включая лактозу, сахарозу, маннит или сорбит; препараты целлюлозы, такие как, например, кукурузный крахмал, пшеничный крахмал, рисовый крахмал, картофельный крахмал, желатин, трагакантовую камедь, метилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, натриевую соль

карбоксиметилцеллюлозы и/или поливинилпирролидон (PVP). При желании могут быть добавлены дезинтегрирующие агенты, такие как сшитый поливинилпирролидон, агар или альгиновая кислота или ее соль, такая как альгинат натрия.

[0146] антитело к TIGIT (и необязательно иммуноонкологический агент) может быть составлено для парентерального введения путем инъекции, например, болюсной инъекцией или непрерывной инфузией. Для инъекции соединение или соединения могут быть составлены в препараты путем растворения, суспендирования или эмульгирования их в водном или неводном растворителе, таком как растительные или другие подобные масла, синтетические глицериды алифатических кислот, сложные эфиры высших алифатических кислот или пропиленгликоль; и, если необходимо, с обычными добавками, такими как солюбилизаторы, изотонические агенты, суспендирующие агенты, эмульгирующие агенты, стабилизаторы и консерванты. В некоторых вариантах осуществления соединения могут быть приготовлены в водных растворах, предпочтительно в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Хенкса, раствор Рингера или физиологический солевой буфер. Составы для инъекций могут быть представлены в стандартной лекарственной форме, например, в ампулах или в контейнерах с множеством доз, с добавленным консервантом. Композиции могут принимать такие формы, как суспензии, растворы или эмульсии в масляных или водных носителях, и могут содержать формулирующие агенты, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты.

[0147] антитело к TIGIT (и, необязательно, иммуноонкологический агент) можно вводить системно трансмукозальным или трансдермальным путем. Для трансмукозального или трансдермального введения в составе используются пенетранты, подходящие для проникающего барьера. Для местного введения средства составляют в виде мазей, кремов, мазей, порошков и гелей. В одном варианте осуществления агентом трансдермальной доставки может быть ДМСО. Системы трансдермальной доставки могут включать, например, пластыри. Для трансмукозального введения в составе используются пенетранты, соответствующие барьеру для проникновения. Такие пенетранты обычно известны в данной области техники. Типичные составы для трансдермальной доставки включают таковые, описанные в патентах США № 6589549; 6544548; 6517864; 6512010; 6465006; 6379696;

6312717 и 6310177, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки.

[0148] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит приемлемый носитель и/или вспомогательные вещества. Фармацевтически приемлемый носитель включает любые растворители, дисперсионные среды или покрытия, которые являются физиологически совместимыми и которые предпочтительно не препятствуют или иным образом не препятствуют активности терапевтического агента. В некоторых вариантах осуществления носитель подходит для внутривенного, внутримышечного, перорального, внутрибрюшинного, трансдермального, местного или подкожного введения. Фармацевтически приемлемые носители могут содержать одно или более физиологически приемлемых соединений, которые, например, стабилизируют композиции или увеличивают или уменьшают абсорбцию активного агента(ов). Физиологически приемлемые соединения могут включать, например, углеводы, такие как глюкоза, сахароза или декстраны, антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или глутатион, хелатирующие агенты, низкомолекулярные белки, композиции, которые уменьшают клиренс или гидролиз активных агентов, или вспомогательные вещества или другие стабилизаторы и/или буферы. Другие фармацевтически приемлемые носители и их составы хорошо известны и обычно описаны, например, в *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 21st Edition, Philadelphia, PA. Lippincott Williams & Wilkins, 2005. Различные фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества хорошо известны в данной области и могут быть найдены, например, в *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (5<sup>th</sup> ed., Ed. Rowe et al., Pharmaceutical Press, Washington, D.C.).

[0149] Дозировки и желаемая концентрация лекарственного средства в фармацевтических композициях по настоящему изобретению могут варьироваться в зависимости от предполагаемого конкретного использования. Определение подходящей дозировки или пути введения хорошо известно специалисту в данной области техники. Подходящие дозировки также описаны в разделе IV выше.

Наборы

[0150] В некоторых вариантах осуществления предлагаются наборы для использования при лечении субъекта, страдающего раком. В некоторых вариантах осуществления набор содержит:

антитело к TIGIT; и

иммуноонкологический агент.

[0151] В некоторых вариантах осуществления антитело к TIGIT является таким, как описано в разделе III выше, например, антитело к TIGIT, обладающее аффинностью, активностью, перекрестной реактивностью, распознаванием эпитопа и/или одной или более CDR, VH и/или VL последовательностями, как описано в разделе III выше. В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологический агент представляет собой ингибитор пути PD-1 или ингибитор пути CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологический агент представляет собой агонист коактиватора T-клеток. В некоторых вариантах осуществления ингибитор пути PD-1 представляет собой антитело к PD-1 или антитело к PD-L1. В некоторых вариантах осуществления иммуноонкологический агент представляет собой пембролизумаб, ниволумаб, дурвалумаб, пидилизумаб или атезолизумаб.

[0152] В некоторых вариантах осуществления наборы могут дополнительно содержать учебные материалы, содержащие указания (то есть протоколы) для практического применения способов по настоящему изобретению (например, инструкции по использованию набора для лечения рака). Хотя учебные материалы обычно содержат письменные или печатные материалы, это не ограничивается ими. Любой носитель информации, способный хранить такие инструкции и передавать их конечному пользователю, предусмотрен настоящим изобретением. Такие носители информации включают, но не ограничиваются ими, электронные носители данных (например, магнитные диски, ленты, картриджи, чипы), оптические носители (например, CD-ROM) и тому подобное. Такие средства информации могут включать адреса интернет-сайтов, которые предоставляют такие учебные материалы.

## VI. ПРИМЕРЫ

[0153] Следующие примеры предоставлены лишь для иллюстрации, но не для ограничения заявленного изобретения.

Пример 1: Генерирование антител к TIGIT

[0154] Полностью человеческие моноклональные антитела к TIGIT были получены с использованием системы презентации антител на основе дрожжей (см., например, Xu et al, "Addressing polyspecificity of antibodies selected from an in vitro yeast presentation system: a FACS-based, high-throughput selection and analytical tool," *PEDS*, 2013, 26:663-670; WO 2009/036379; WO 2010/105256; и WO 2012/009568). Восемь наивных человеческих

синтетических дрожжевых библиотек, каждая из которых имеет  $\sim 10^9$  разнообразие, были подвергнуты скринингу. Для первых двух раундов отбора была использована методика сортировки магнитных частиц с использованием системы Miltenyi MACS, как описано ранее (см., например, Siegel et al, "High efficiency recovery and epitope-specific sorting of an scFv yeast display library," *J Immunol Methods*, 2004, 286:141-153). Вкратце, дрожжевые клетки ( $\sim 10^{10}$  клеток/библиотеку) инкубировали с 5 мл 10 нМ биотинилированного Fc-слитого антигена в течение 30 минут при 30°C в промывочном буфере (фосфатно-буферный солевой раствор (PBS) / 0,1% бычий сывороточный альбумин (BSA)). После однократной промывки 40 мл ледяного промывочного буфера осадок клеток ресуспендировали в 20 мл промывочного буфера и к дрожжам добавляли стрептавидиновые микрочастицы (500мкл) и инкубировали в течение 15 минут при 4 °C. Затем дрожжи осаждали, ресуспендировали в 20 мл промывочного буфера и загружали на колонку Miltenyi LS. После загрузки 20 мл на колонку, ее промывали 3 раза 3 мл промывочного буфера. Колонку затем удаляли из магнитного поля и дрожжи элюировали 5 мл питательной среды и затем выращивали в течение ночи. Следующие раунды селекции были выполнены с использованием проточной цитометрии. Приблизительно  $2 \times 10^7$  дрожжей осаждали, трижды промывали промывочным буфером и инкубировали при 30°C с 10 нМ Fc-слитого антигена и снижающимися концентрациями биотинилированного мономерного антигена (от 100 до 1 нМ) в равновесных условиях, 10 нМ биотинилированный Fc-слитых антигенов или 100 нМ мономерных антигенов различных видов для получения перекрестной реактивности видов или реагентом для снижения полиспецифичности (PSR) для удаления неспецифических антител из селекции. Для снижения PSR библиотеки инкубировали с разведением 1:10 биотинилированного реагента PSR, как описано ранее (см., например, Xu et al, *supra*). Затем дрожжи дважды промывали промывочным буфером и окрашивали LC-FITC (разбавленным 1: 100) и либо SA-633 (разбавленным 1: 500), либо EA-PE (экстравидин-R-PE, разбавленным 1:50) вторичными реагентами в течение 15 минут при 4 °C. После промывки дважды промывочным буфером осадок клеток ресуспендировали в 0,3 мл промывочного буфера и переносили в пробирки с крышками с фильтром. Сортировку проводили с использованием сортировщика FACS ARIA (BD Biosciences) и определяли сортировочные интервалы для отбора антител с желаемыми характеристиками. Отборочные раунды

повторяли до тех пор, пока не была получена популяция со всеми желаемыми характеристиками. После последнего раунда сортировки дрожжи высевали и отбирали отдельные колонии для характеристики.

[0155] Антигены включали рекомбинантный димерный TIGIT-Fc человека (Acro Biosystems TIT-H5254), мономерный TIGIT человека (Sino Biological 10917-H08H), димерный TIGIT-Fc мыши (R & D Systems, 7267-TG) и мономерный TIGIT мыши (Sino Biologicals 50939-M08H).

[0156] *Наивная кампания:* 744 клона были секвенированы с получением 345 уникальных клонов (уникальный CDRH3). 18 VH зародышевых линий были представлены в клонах.

[0157] *Кампания по диверсификации легких цепей:* Плазмиды тяжелых цепей (VH) из обогащенного связующего пула из шестого раунда наивных селекционных отборов были извлечены из дрожжей посредством техники разбивания и захвата, размножены и впоследствии очищены от *E. Coli*, и затем трансформированы в библиотеку легких цепей с разнообразием из  $10^7$ .

[0158] Селекции были выполнены по существу в тех же условиях, что и для наивной селекции. Вкратце, один раунд обогащения магнитных частиц сопровождался тремя раундами селекции способом проточной цитометрии. В цикле обогащения магнитных частиц использовали 10 нМ биотинилированный Fc-слитый антиген. Первый раунд на проточном цитометре состоял из раунда позитивной селекции с использованием 100 нМ биотинилированного моновалентного антигена. За этим следовал второй раунд, который состоял из раунда отрицательной селекции на уменьшение PSR. Последний (третий) раунд состоял из раунда положительной селекции, в котором моновалентный антиген титровали при 100 нМ, 10 нМ, 1 нМ. Для всех библиотек, дрожжи из 1 нМ селекции из этого третьего раунда высевали, и отдельные колонии отбирали и характеризовали. Всего 728 клон были секвенированы с получением 350 уникальных комбинаций HC/LC (93 уникальных CDRH3).

[0159] Всего 695 уникальных клонов было идентифицировано между наивной и периодической кампаниями с легкой цепью.

Пример 2: Характеристика антител к TIGIT

[0160] Для получения и дальнейшей оценки было отобрано 65 клонов, представляющих 12 VH зародышевых линий и 9 VL зародышевых линий.

Производство и очистка антител

[0161] Клоны дрожжей выращивали до насыщения и затем

индуцировали в течение 48 ч при 30 °С при встряхивании. После индукции дрожжевые клетки осаждали и супернатанты собирали для очистки. IgG очищали с использованием колонки с белком А и элюировали уксусной кислотой, рН 2,0. Фрагменты Fab были получены путем расщепления папаином и очищены с помощью KappaSelect (GE Healthcare LifeSciences).

Связывание антител к TIGIT с рекомбинантным белком человека и мыши

[0162] Измерения аффинности проводили на ForteBio Octet RED384, как правило, как описано ранее (см., например, Estep et al., "High throughput solution-based measurement of antibody-antigen affinity and epitope binning," *Mabs*, 2013, 5:270-278). Вкратце, измерения аффинности с помощью ForteBio выполняли путем загрузки IgG в режиме онлайн на датчики АНQ. Датчики уравнивали в автономном режиме в буфере для анализа в течение 30 минут и затем наблюдали в режиме онлайн в течение 60 секунд для установления исходного уровня. Датчики с нагруженными IgG подвергали воздействию 100 нМ антигена (димерного Fc-слитого антигена или мономерного антигена) в течение 3 минут, а затем переносили в буфер для анализа в течение 3 минут для измерения несоответствия. Все кинетики связывания и диссоциации анализировали с использованием модели связывания 1: 1.

[0163] Из 65 клонов IgG, 43 имели сродство к мономеру TIGIT <100 нМ. Из 65 клонов IgG, 34 перекрестно реагировали с TIGIT-Fc мыши. Аффинность связывания для выбранных клонов представлена в Таблице 1 ниже.

Эпитопный биннинг/лигандный конкурентный анализ

[0164] Эпитопный биннинг/блокирование лиганда осуществляли с использованием стандартного анализа перекрестного блокирования в сэндвич-формате в системе ForteBio Octet RED384. Контрольный анти-целевой IgG загружали на датчики АНQ, и незанятые Fc-связывающие сайты на датчике блокировали нерелевантным антителом IgG1 человека. Затем датчики подвергали воздействию 100 нМ целевого антигена, и затем второго анти-целевого антитела или лиганда (CD155-Fc человека (Sino Biological, 10109-H02H)). Дополнительное связывание вторым антителом или лигандом после ассоциации антигена указывает на незанятый эпитоп (не конкурент), в то время как отсутствие связывания указывает на блокирование эпитопа (конкурент или блокирование лиганда).

[0165] Четыре биннинговых антитела (не взаимоисключающие)

были использованы для оценки бина, и были идентифицированы пять перекрывающихся биннинговых профилей. 63 из 65 антител к TIGIT конкурировали с лигандом за связывание с hTIGIT-Fc. Биннинговые профили и результаты конкуренции лигандов для выбранных клонов представлены в Таблице 1 ниже.

Таблица 1. Данные по эпитопному биннингу, конкурированию лигандов и аффинности для выбранных анти-TIGIT клонов

Клон	Бин код	Конкурирование CD155	IgG KD TIGIT-Fc человека (M)	IgG KD TIGIT мономер человека (M)	IgG KD TIGIT-Fc мыши (M)
2	1, 2, 3, 4	Да	9.56E-10	1.01E-08	2.03E-09
3	1, 2, 3, 4	Да	2.77E-09	7.36E-08	5.64E-09
5	1, 2, 3, 4	Да	9.85E-10	1.41E-08	3.25E-09
13	1, 2, 3	Да	5.43E-10	2.56E-09	1.16E-10
14	1, 2, 3	Да	2.01E-09	5.87E-08	2.43E-09
16	1, 2, 3	Да	6.90E-10	2.06E-09	1.05E-08
18	1, 2, 3	Да	2.39E-09	5.08E-08	8.82E-09
21	1, 2, 3	Да	5.85E-10	2.18E-09	N.B.
22	1, 2, 3	Да	7.90E-10	1.38E-08	1.05E-08
25	1, 2, 3	Да	6.20E-10	6.18E-10	1.10E-09
27	1, 2, 3	Да	5.58E-10	2.32E-09	N.B.
54	1, 2, 3	Да	6.89E-10	3.49E-09	N.B.

Примечания:

N.B. = Не связываются в условиях данного анализа

Бин-код и данные о конкурировании CD155 были сгенерированы в системе ForteBio Octet RED384 с использованием стандартного анализа перекрестной блокировки в сэндвич-формате, как описано в Примере 2.

KD данные были получены в системе ForteBio Octet RED384, как описано в Примере 2.

Связывание антител к TIGIT с TIGIT человека, мыши и яванского макака, сверхэкспрессируемых в клетках НЕК 293

[0166] Клетки НЕК 293 были сконструированы так, чтобы стабильно экспрессировать высокие уровни TIGIT человека, мыши или яванского макака посредством лентивирусной трансдукции. Приблизительно 100000 родительских клеток НЕК 293 (TIGIT-отрицательных) или клеток НЕК 293 со сверхэкспрессией TIGIT человека, мыши или яванского макака окрашивали 100 нМ каждым антителом к TIGIT в течение 5 минут при комнатной температуре. Затем клетки дважды промывали промывочным буфером и инкубировали с античеловеческим IgG, конъюгированным с PE, в течение 15 минут на льду. Затем клетки дважды промывали промывочным буфером и

анализировали с помощью проточной цитометрии на приборе FACS Canto II (BD Biosciences). Соотношение сигнал-базовая линия (FOB) рассчитывали как среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) анти-TIGIT клона, связанного с клетками, содержащими мишень, деленную на MFI анти-TIGIT клона, связанного с клетками не содержащими мишень.

[0167] Как показано на Фиг.1, все 65 антител показали специфическое связывание с линией 293-hTIGIT (FOB > 10, как показано горизонтальной черной линией на диаграмме). 53 клон специфически связывают линию 293-cyTIGIT, в то время как 31 клон специфически связывают линию 293-mTIGIT.

Анализ полиспецифического реагента (PSR)

[0168] Оценку связывания с полиспецифическим реагентом проводили для определения специфичности по отношению TIGIT, как описано ранее (см., например, Xu et al, *supra*). Вкратце, биотинилированный реагент PSR, разбавленный 1:10 из начального раствора, инкубировали с IgG-презентирующими дрожжами в течение 20 минут на льду. Клетки промывали и метили с помощью EA-PE (экстравидин-R-PE) и считывали на анализаторе FACS. Оценка полиспецифического связывания осуществляется по шкале от 0 до 1 и коррелирует с контрольными IgG с низким, средним и высоким неспецифическим связыванием с оценкой 0, указывающей на отсутствие связывания, и оценкой 1, указывающей на очень высокое неспецифическое связывание.

[0169] 62 из 65 клонов были оценены как неполиспецифично связующие с оценкой PSR <0,10. Три клон были оценены как слабо полиспецифично связующие (оценка PSR 0,10-0,33).

Хроматографический анализ гидрофобного взаимодействия

[0170] Хроматографию с гидрофобным взаимодействием (HIC) проводили, как описано ранее (Estep et al., *supra*). Вкратце, в образцы с 5 мкг IgG добавляли раствор подвижной фазы А (1,8 М сульфата аммония и 0,1 М фосфата натрия при pH 6,6) до достижения конечной концентрации сульфата аммония около 1 М перед анализом. Использовали колонку Sepax Proteomix HIC butyl-NP5 с линейным градиентом подвижной фазы А и раствора подвижной фазы В (0,1 М фосфата натрия, pH 6,5) в течение 20 минут при скорости потока 1 мл/мин с контролем УФ-поглощения при 280 нм.

[0171] Повышенное удерживание антител на гидрофобных колонках коррелировало с повышенной гидрофобностью и склонностью к плохой экспрессии, агрегации или осаждению во время очистки.

Пять из 65 клонов имели высокое время удерживания НИС > 11,5 минут, 10 клонов имели среднее время удерживания НИС 10,5–11,5 минут, и остальные клоны имели низкое время удерживания НИС.

Пример 3: Связывание антител к TIGIT с TIGIT человека, мыши и яванского макака, сверхэкспрессируемых на поверхности первичных Т-клеток.

[0172] Было показано, что 65 антител, специфичных к рекомбинантному белку TIGIT человека и TIGIT человека, экспрессированному на поверхности клеток НЕК 293, оценивали по их способности связывать эндогенный TIGIT на поверхности первичных Т-клеток периферической крови человека. Антитела также оценивали на перекрестную реактивность к TIGIT яванского макака на поверхности Т-клеток периферической крови, и 35 из 65 клонов оценивали на перекрестную реактивность к TIGIT мыши на поверхности активированных Т-клеток селезенки.

[0173] Пан-Т-клетки человека были отрицательно выделены из продукта лейкафереза до чистоты 99%. 100000 клеток окрашивали при 4 °С в течение 30 минут по 20 мкг/мл каждого антитела к TIGIT. антитела к TIGIT выявляли с помощью поликлонального козьего анти-человеческого IgG, конъюгированного с PE (Jackson ImmunoResearch 109-116-098). Образцы анализировали на проточном цитометре CytoFLEX. Процент TIGIT+популяции лимфоцитов дающих сигнал выше порогового значения FSC/SSC определяли для каждого антитела с использованием окрашивания только анти-человеческим IgG-PE для определения порога позитивности.

[0174] Белые кровяные клетки яванского макака выделяли из цельной крови путем лизиса эритроцитов (eBioscience 00-4300). 200 000 клеток окрашивали при 4 °С в течение 30 минут по 20 мкг/мл каждого антитела к TIGIT. антитела к TIGIT выявляли с помощью поликлонального козьего анти-человеческого IgG, адсорбированного против иммуноглобулинов обезьяны, конъюгированного с AlexaFluor647 (SouthernBiotech 2049-31), и Т-клетки идентифицировали путем контрастного окрашивания FITC-конъюгированным анти-CD3 клоном SP34 (BD Pharmingen 556611). Образцы анализировали на проточном цитометре CytoFLEX. Процент TIGIT+ популяции CD3+ определяли для каждого антитела, используя только окрашивание анти-человеческим IgG-PE для определения порога позитивности.

[0175] Т-клетки мыши BALB/с выделяли из селезенки путем негативного отбора (Stem Cell Technologies 19851A) до > 99%

чистоты. Клетки активировали в течение 24 часов связанным с планшетом анти-CD3 клоном 145-2C11 (BioLegend 100302), чтобы активировать TIGIT. 200000 активированных клеток окрашивали при 4 °C в течение 30 минут 20 мкг/мл каждого антитела к TIGIT (35 из 65 протестированных клонов). антитела к TIGIT выявляли с помощью поликлонального козьего анти-человеческого IgG, конъюгированного с PE (Jackson ImmunoResearch 109-116-098). Образцы анализировали на проточном цитометре FACSCalibur. Среднюю интенсивность флуоресценции популяции лимфоцитов дающих сигнал выше порогового значения FSC/SSC определяли для каждого антитела.

[0176] На Фиг. 2 показано связывание 65 клонов антител к TIGIT и нерелевантного изотипа контрольного антитела с первичными Т-клетками человека, яванского макака и мыши. Оба клон 13 и 25 показали сильное связывание со всеми тремя видами Т-клеток.

Титруемое связывание антител к TIGIT с клеточной поверхностью, экспрессирующей TIGIT

[0177] Клетки HEK 293 были сконструированы так, чтобы стабильно экспрессировать высокие уровни TIGIT человека, мыши или яванского макака посредством лентивирусной трансдукции. 200000 клеток 293-TIGIT окрашивали при 4 °C в течение 30 минут с помощью 10-точечного 3-кратного титрования (от 30 до 0,002 мкг/мл) каждого антитела к TIGIT. антитела к TIGIT выявляли с помощью поликлонального козьего анти-человеческого IgG, конъюгированного с PE (Jackson ImmunoResearch 109-116-098). Образцы анализировали на проточном цитометре CytoFLEX. Среднюю интенсивность флуоресценции популяции дающей сигнал выше порогового значения FSC/SSC определяли для каждого антитела. Для получения значений EC50 в GraphPad Prism 6 использовалась нелинейная регрессия преобразованных в Log (X) данных. Ни одно из антител к TIGIT не проявляло связывания с родительскими клетками HEK 293 (TIGIT-) (данные не показаны). На Фиг. 3A-C показано титрование связывания, и на Фиг. 3D представлено EC50 связывания восьми клонов антител к TIGIT (клон 2, клон 5, клон 13, клон 16, клон 17, клон 20, клон 25 и клон 54) с TIGIT человека, яванского макака и мыши, экспрессируемых на клетках HEK 293.

[0178] Т-клетки мыши C57BL/6 выделяли из селезенки путем негативного отбора (Stem Cell Technologies 19851A) до > 99%

чистоты. Клетки активировали в течение 24 часов связанным с планшетом анти-CD3 клоном 145-2C11 (BioLegend 100302), чтобы активировать TIGIT. 200000 клеток окрашивали при 4 °C в течение 30 минут с 8-точечным 3-кратным титрованием (от 30 до 0,014 мкг/мл) каждого антитела к TIGIT. антитела к TIGIT выявляли с помощью поликлонального козьего анти-человеческого IgG, конъюгированного с PE (Jackson ImmunoResearch 109-116-098). Образцы анализировали на проточном цитометре FACSCalibur. Среднюю интенсивность флуоресценции популяции лимфоцитов дающих сигнал выше порогового значения FSC/SSC определяли для каждого антитела. Для получения значений EC50 в GraphPad Prism 6 использовалась нелинейная регрессия преобразованных в Log (X) данных. На Фиг.4 представлено титрование связывания и EC50 связывания анти-TIGIT клонов 13 и 25 с активированными Т-клетками селезенки мыши.

Пример 4: антитела к TIGIT блокируют связывание лиганда CD155 и CD112 с TIGIT, экспрессируемым на клеточной поверхности

**[0179]** Клетки НЕК 293 были сконструированы так, чтобы стабильно экспрессировать высокие уровни TIGIT человека или мыши с помощью лентивирусной трансдукции. hCD155-Fc (Sino Biological 10109-H02H), hCD112-Fc (Sino Biological 10005-H02H) и mCD155-Fc (Sino Biological 50259-M03H) были конъюгированы с AlexaFluor647 (ThermoFisher A30009). 200000 клеток 293-hTIGIT или 293-mTIGIT совместно инкубировали с 1 мкг/мл CD155-Fc-AlexaFluor647 или 5 мкг/мл CD112-Fc-AlexaFluor647 и 12-точечным, 2-кратным титрованием (от 10 до 0,005 мкг/мл) каждого антитела к TIGIT или изотипного контрольного антитела. Образцы анализировали на проточном цитометре CytoFLEX. Среднюю интенсивность флуоресценции популяции дающей сигнал выше порогового значения FSC/SSC определяли для каждого антитела. Процент блокирования рассчитывали относительно MFI контроля без антител. Нелинейная регрессия преобразованных в Log (X) данных была выполнена в GraphPad Prism 6.

**[0180]** Как представлено на Фиг.5А-В, шесть клонов антител к TIGIT (клон 2, клон 5, клон 13, клон 17, клон 25 и клон 55) были протестированы, и пять из шести клонов (клон 2, клон 5, клон 13, клон 17 и клон 25) значительно блокировали взаимодействие CD155 с TIGIT, экспрессированным на клетках НЕК 293, как для CD155 человека/ TIGIT человека, так и для CD155 мыши/TIGIT мыши. Клон 55 специфически связывает TIGIT человека, но не конкурирует с

hCD155-Fc за связывание с hTIGIT-Fc в конкурентном анализе лиганда ForteBio Octet. Аналогично, клон 55 не эффективно блокировал взаимодействие hCD155 с клеточной линией 293-hTIGIT. Клон 2, клон 5, клон 13, клон 17 и клон 25 также были способны прервать связывание CD112 человека с TIGIT человека. Как наблюдалось для CD155, клон 55 был гораздо менее эффективен в блокировании взаимодействия CD112-TIGIT. См., Фиг. 6.

Пример 5: Активность антител к TIGIT *in vitro* в биоанализе блокирования TIGIT/CD155

[0181] Активность антител к TIGIT может быть функционально охарактеризована с использованием анализа блокирования TIGIT/CD155 (например, TIGIT/CD155 Blockade Bioassay Kit, Promega Corp., Madison, WI), в котором экспрессия репортерного гена индуцируется или усиливается, когда антитело блокирует взаимодействие TIGIT/CD155. Биоанализ блокирования TIGIT/CD155 включает два типа клеток: эффекторную клетку, экспрессирующую TIGIT, CD226 и комплекс TCR на клеточной поверхности и содержащую репортерный ген люциферазы; и искусственную антигенпрезентирующую клетку, которая экспрессирует CD155 и активатор TCR на клеточной поверхности. В данном биоанализе экспрессия люциферазы требует вовлечения TCR плюс костимулирующий сигнал. Взаимодействие CD155-TIGIT имеет более высокую аффинность, чем взаимодействие CD155-CD226, что приводит к общей ингибирующей передаче сигналов и отсутствию экспрессии люциферазы. Блокада взаимодействия CD155-TIGIT позволяет костимуляции CD155-CD226 управлять экспрессией люциферазы.

[0182] Эффекторные клетки Jurkat, экспрессирующие как TIGIT, так и CD226, совместно культивировали с искусственными антигенпрезентирующими клетками CHO-K1 (aAPC), экспрессирующими активатор TCR и CD155. Эффекторные клетки Jurkat содержат репортерный ген люциферазы, управляемый промотором IL-2. В отсутствие блокирующих антител к TIGIT взаимодействие CD155-TIGIT приводит к коингибированию T-клеток и отсутствию активности промотора IL-2. После добавления антител к TIGIT взаимодействие CD155-TIGIT прерывается, позволяя CD155 связываться с CD226 для подачи костимулирующего сигнала и управления экспрессией люциферазы.

[0183] aAPC высевали в 96-луночные планшеты и оставляли срастаться с поверхностью планшета в течение ночи. На следующий день в планшет добавляли 20 мкг/мл каждого антитела к TIGIT или

изотипного контрольного антитела, и эффекторные клетки Jurkat. После 6-часовой инкубации при 37 °С клетки лизировали и добавляли субстрат люциферазы. Активность люциферазы определяли количественно на планшет-ридере. Активность люциферазы рассчитывали как кратность сигнала по сравнению с контролем без антител.

[0184] Как показано на фиг.7А-7В, 12 клонов антител к TIGIT продемонстрировали функциональное блокирование в данном биоанализе.

Пример 6: Активность антител к TIGIT *in vitro* в комбинированном биоанализе с TIGIT/PD-1

[0185] Синергетическая активность антител к TIGIT в комбинации с анти-PD-1 агентами (например, антителами к PD-1) может быть функционально охарактеризована с использованием комбинированного биоанализа TIGIT/PD-1, в котором экспрессия репортерного гена усиливается, когда антитела блокируют как взаимодействие TIGIT/CD155, так и взаимодействие PD-1/PD-L1. Биоанализ включает два типа клеток: эффекторную клетку, экспрессирующую TIGIT, CD226, PD-1 и комплекс TCR на поверхности клетки и содержащую репортерный ген люциферазы; и искусственную антигенпрезентирующую клетку, которая экспрессирует CD155, PD-L1 и активатор TCR на поверхности клетки. В данном биоанализе экспрессия люциферазы требует вовлечения TCR плюс костимулирующий сигнал. Взаимодействие CD155-TIGIT имеет более высокую аффинность, чем взаимодействие CD155-CD226, что приводит к общей ингибирующей передаче сигналов и отсутствию экспрессии люциферазы. Кроме того, связывание PD-L1 с PD-1 ингибирует экспрессию люциферазы. Блокирование как взаимодействия CD155-TIGIT, так и взаимодействия PD-1/PD-L1 удаляет ингибирование и позволяет костимуляции CD155-CD226 управлять экспрессией люциферазы.

[0186] Эффекторные клетки Jurkat, экспрессирующие PD-1, TIGIT и CD226, совместно культивировали с искусственными антигенпрезентирующими клетками CHO-K1 (aAPC), экспрессирующими активатор TCR, PD-L1 и CD155. Эффекторные клетки Jurkat содержат репортерный ген люциферазы, управляемый промотором IL-2. В отсутствие блокирующих антител к TIGIT взаимодействие PD-L1-PD-1 и CD155-TIGIT приводит к совместному ингибированию Т-клеток и отсутствию активности промотора IL-2. После добавления антител к PD-1 и антител к TIGIT взаимодействие PD-L1-PD-1 блокируется,

освобождая один коингибирующий сигнал, и взаимодействие CD155-TIGIT прерывается, что позволяет CD155 связываться с CD226 для подачи ко-стимулирующего сигнала и стимулирования выработки люциферазы.

[0187] аАРС высевали в 96-луночные планшеты и оставляли срастаться с поверхностью планшета в течение ночи. На следующий день проводили 10-точечное 2,5-кратное титрование (от 100 до 0,03 мкг/мл) каждого отдельного антитела к TIGIT или антител к PD-1 (клон EN12.2H7, BioLegend, Сан-Диего, Калифорния) или антитело к TIGIT+антитело к PD-1 (соотношение 1: 1) и эффекторные клетки Jurkat добавляли в планшет. После 6-часовой инкубации при 37 °С клетки лизировали и добавляли субстрат люциферазы. Активность люциферазы определяли количественно на планшет-ридере. Активность люциферазы рассчитывали как кратность сигнала по сравнению с контролем без антител. Как представлено на Фиг.8, ни анти-TIGIT, ни антител к PD-1 в одиночку не приводили к драматической активации Jurkat, однако комбинация либо анти-TIGIT клона 13, либо клона 25 с анти-PD-1 давала сильную активацию.

Пример 7: Активность антител к TIGIT *in vivo* в модели сингенной опухоли СТ26 у мышей BALB/c

[0188] На основе сродства к мышиному TIGIT анти-TIGIT клон 13 был выбран для оценки в мышиную модель сингенной опухоли. IgG1 мыши и IgG2a химеры мыши родительского полностью человеческого анти-TIGIT клона 13 были созданы для экспериментов *in vivo*, чтобы ответить на вопрос, влияет ли изотип Fc на *in vivo* эффективность антагонистических антител к TIGIT. *In vitro* химерные антитела проявляли сходную активность с родительским антителом hIgG1 в отношении (1) связывания с TIGIT человека, мыши и яванского макака, (2) блокирования связывания лиганда CD155 и CD112 с TIGIT экспрессированным на клеточной поверхности и (3) активности в биоанализе блокирования CD155-TIGIT. См. Фиг. 9А-9Н.

[0189] 8-недельных мышей BALB/c со средней массой тела 19 г получали от Charles River Laboratories. Мышам имплантировали подкожно 300 000 клеток карциномы толстой кишки СТ26 на правый бок. Опухолям позволяли прогрессировать до тех пор, пока средний групповой объем опухоли не составил 72 мм<sup>3</sup> (диапазон 48-88 мм<sup>3</sup>) на 7-й день после инокуляции опухоли. Животные были разделены на 10 групп лечения с n=10 парным совпадением, так что средний

объем опухоли в группе был одинаковым во всех группах лечения. Длина и ширина опухоли были измерены, и объем опухоли был рассчитан по формуле  $\text{Объем (мм}^3\text{)} = 0,5 * \text{Длина} * \text{Ширина}^2$ , где длина представляет собой наиболее длинный размер. Клон анти-TIGIT 13 mIgG1, клон анти-TIGIT 13 mIgG2a и клон анти-PD-1 RMP1-14 (BioXCell) разбавляли до соответствующей концентрации для дозирования в стерильном PBS. Стерильный PBS был использован в качестве контроля носителя. антитела к TIGIT дозировали в дозе 5 или 20 мг/кг посредством внутрибрюшинной инъекции два раза в неделю в течение 3 недель (всего 6 доз). антитело к PD-1 вводили в дозе 5 мг/кг посредством внутрибрюшинной инъекции два раза в неделю в течение 2 недель (всего 4 дозы). Дозирование начинали в день распределения (1-й день исследования). Измерения объема опухоли и массы тела выполняли два раза в неделю, пока мыши не достигли предела объема опухоли 2000 мм<sup>3</sup>. Ни у одного из животных не наблюдалось снижения массы тела относительно массы тела до введения дозы, что указывает на исключительную переносимость всех тестируемых агентов.

[0190] Как представлено на Фиг. 10А, один анти-mPD-1 не оказывал никакого влияния на прогрессирование опухоли. Анти-TIGIT-химера mIgG1 клона 13 («13-1»), которая не задействует эффективно активирующие рецепторы Fcγ, не опосредовала какую-либо противоопухолевую активность, ни в качестве отдельного агента, ни в комбинации с анти-PD-1. Напротив, химера mIgG2a клона 13 («13-2»), которая способна связывать активирующие Fcγ рецепторы, замедляла прогрессирование опухоли (86,5% (5 мг/кг) или 74,4% (20 мг/кг) ингибирование роста опухоли в день 18). У трех из десяти животных в группе с единичным агентом 13-2 5 мг/кг наблюдались полные регрессии опухоли, которые оставались стабильными до конца исследования (день исследования 46). В группе с единичным агентом 13-2 20 мг/кг два из десяти животных показали частичную регрессию опухоли (определяемую как объем опухоли <50% от исходного объема для трех последовательных измерений). На Фиг. 10А представлено, что добавление анти-PD-1 к химере клона 13 mIgG2a (13-2) не увеличивало эффективность по сравнению с единичным 13-2 (ингибирование роста опухоли на 18 день 53,8% (5 мг/кг анти-TIGIT) + 5 мг/кг анти-PD1) против 86,5% (только 5 мг/кг анти-TIGIT) и 89,6% (20 мг/кг анти-TIGIT+5 мг/кг анти-PD-1) против 74,4% (20 мг/кг только анти-TIGIT). Подобные числа животных с

полным и частичным лечебным эффектом наблюдались в комбинированных группах. См., например, Фиг. 10В-10К.

Пример 8: Оптимизация антител и характеристика оптимизированных антител

[0191] Клоны антител 2, 13, 16 и 25 из первичного обнаружения были отобраны для дальнейшего улучшения аффинности. Оптимизацию антител проводили путем введения разнообразия в переменную область тяжелой цепи. К вышеупомянутым линиям были применены два цикла оптимизации. Первый цикл состоял из подхода диверсификации CDRH1 и CDRH2, в то время как во втором цикле был применен подход мутагенеза CDRH3.

[0192] Подход CDRH1 и CDRH2; CDRH3 одиночного антитела рекомбинировали в готовую библиотеку с вариантами CDRH1 и CDRH2 с разнообразием  $1 \times 10^8$ . Селекции были затем выполнены с одним раундом MACS и четырьмя раундами FACS, как описано для наивного обнаружения.

[0193] В первом раунде FACS, библиотеки сортировали по 1 нМ мономерному связыванию TIGIT. Второй раунд FACS был раундом снижения PSR для снижения полиспецифичности. Последние два раунда были раундами положительного отбора с использованием родительского Fab или IgG давления для получения высокой аффинности. Давление Fab/IgG проводили следующим образом: антиген инкубировали с 10-кратным родительским Fab или IgG, и затем инкубировали с дрожжевыми библиотеками. Селекции обогащены для IgG с лучшим сродством, чем родительский Fab или IgG. Перекрестная реактивность видов была проверена в последних двух раундах FACS.

[0194] Мутагенез CDRH3: Библиотеки были созданы с диверсификацией CDRH3 путем рандомизации положений в CDRH3. Селекции были выполнены с одним раундом MACS и тремя раундами FACS, как описано ранее. Отрицательные селекции PSR, перекрестную реактивность видов, аффинное давление и сортировку проводили для получения популяции с желаемыми характеристиками.

#### Измерения MSD-SET $K_D$

[0195] Измерения равновесной аффинности выполняли, как правило, как описано ранее (Estep et al., *supra*). Вкратце, равновесное титрование в растворе (SET) выполняли в PBS+0,1% BSA, не содержащем IgG (PBSF), с биотинилированным мономером TIGIT-His человека, концентрация которого оставалась постоянной при 50 пМ и инкубировали с 3-5-кратными серийными разведениями

антител, начиная около с 5 нМ. Антитела (20 нМ в PBS) наносили на стандартные планшеты для связывания MSD-ECL в течение ночи при 4°C или при комнатной температуре в течение 30 минут. Затем планшеты блокировали 1% BSA в течение 30 минут при встряхивании при 700 об/мин, после чего три раза промывали буфером для промывки (PBSF+0,05% Твин 20). Образцы SET наносили и инкубировали на планшетах в течение 150 с при встряхивании при 700 об/мин с последующей промывкой. Антиген, захваченный на планшете, детектировали с помощью 250 нг/мл меченого сульфотагом стрептавидина в PBSF путем инкубации на планшете в течение 3 минут. Планшеты трижды промывали промывочным буфером и затем считывали на приборе MSD Sector Imager 2400, используя 1х считывающий буфер T с поверхностно-активным веществом. Процент свободного антигена наносили на график как функцию титрованного антитела в Prism и подставляли в квадратное уравнение для извлечения  $K_D$ . Для повышения производительности в ходе экспериментов MSD-SET, включая подготовку образцов SET, использовались роботы для работы с жидкостью.

[0196] Связывание оптимизированных антител с His-меченым TIGIT человека, TIGIT-Fc cyno и TIGIT-Fc мыши измеряли с использованием системы ForteBio, как описано выше. Оптимизированные антитела также тестировали на блокирование лиганда в анализе конкуренции с лигандом CD155 и на связывание с клеточными линиями TIGIT HEK человека, Cyno TIGIT HEK, TIGIT HEK мыши и родительской HEK, как описано выше.

[0197] Данные аффинности и данные по связыванию с клетками для антител, оптимизированных по аффинности, представлены в Таблице 2 ниже.

Таблица 2. Данные аффинности и связывания с клетками для антител, оптимизированных по аффинности

Номер клона	ForteBio IgG К <sub>D</sub> Человек TIGIT- His (M) Моновалентное	ForteBio IgG К <sub>D</sub> Суно TIGIT-Fc (M) Avid	ForteBio IgG К <sub>D</sub> Мышь TIGIT-Fc (M) Avid	MSD IgG К <sub>D</sub> (M) Человек TIGIT-His	Связывание с клетками TIGIT НЕК Человека (FOB Кратность по сравнению с фоном)	Связывание с клетками TIGIT НЕК Суно (FOB Кратность по сравнению с фоном)	Связывание с клетками TIGIT НЕК Мыши (FOB Кратность по сравнению с фоном)
2	8.18E-09	1.34E-09	1.76E-09	NA	158	162	73
2C	5.18E-10	9.84E-10	3.92E-10	1.60E-11	193	224	100
13	2.63E-09	1.04E-09	3.41E-10	NA	212	224	119
13A	6.27E-10	1.12E-09	3.70E-10	2.50E-11	206	240	115
13B	6.10E-10	1.05E-09	3.30E-10	5.30E-12	201	235	102
13C	5.63E-10	1.07E-09	3.29E-10	8.60E-12	194	281	116
13D	5.71E-10	1.16E-09	3.64E-10	5.00E-12	190	245	116
16	2.52E-09	4.67E-09	9.07E-09	NA	192	27	19
16C	9.11E-10	4.25E-09	8.01E-10	6.30E-12	208	157	99
16D	5.96E-10	1.15E-09	2.63E-09	1.30E-11	199	241	63
16E	7.78E-10	1.36E-09	3.70E-09	1.10E-11	195	186	56
25	1.27E-09	1.50E-09	9.67E-10	NA	205	247	117
25A	1.10E-09	1.64E-09	8.23E-10	1.80E-11	207	238	119
25B	1.16E-09	1.40E-09	7.19E-10	2.20E-11	222	291	129
25C	6.97E-10	1.24E-09	4.94E-10	5.60E-12	216	286	124
25D	8.46E-10	1.18E-09	5.80E-10	2.70E-11	225	272	137
25E	8.51E-10	1.18E-09	5.66E-10	1.30E-11	204	252	116

## Пример 9: Эпитопное картирование

[0198] Эпитопы двух из моноклональных антител, раскрытых в данном документе, клона 13 и клона 25, были охарактеризованы с помощью пептидной матрицы. Для реконструкции эпитопов молекулы-мишени была синтезирована библиотека имитаторов эпитопов на основе пептидов с использованием Fmoc- твердофазного синтеза. Аминофункционализирующая полипропиленовая подложка была получена путем прививки состава гидрофильного полимера, защищенного документами на интеллектуальную собственность, с последующим взаимодействием с трет-бутилоксикарбонилгексаметилендиамином (BocHMDA) с использованием дициклогексилкарбодиимида (DCC) и N-гидроксисбензотриазола (HOBT), и последующим отщеплением Boc-группы с помощью трифторуксусной кислоты (ТФУ). Для синтеза пептидов были использованы стандартный Fmoc-пептидный синтез на аминокфункционализированной твердой подложке с помощью модифицированных станций для работы с жидкостью JANUS (Perkin Elmer).

[0199] Синтез структурных имитаторов был выполнен с использованием запатентованной технологии химически связанных пептидов на скаффолдах (CLIPS) (PerScan). Технология CLIPS позволяет структурировать пептиды в отдельные петли, двойные петли, тройные петли, листообразные складки, спиралевидные складки и их комбинации. Шаблоны CLIPS связаны с остатками цистеина. Боковые цепи множества цистеинов в пептидах связаны с одной или двумя матрицами CLIPS. Например, 0,5 мМ раствор P2 CLIPS (2,6-бис(бромметил)пиридин) растворяют в бикарбонате аммония (20 мМ, pH 7,8)/ацетонитриле (1:3 (об./об.)). Данный раствор добавляется в пептидные матрицы. Матрица CLIPS будет связываться с боковыми цепями двух цистеинов, которые присутствуют в связанных с твердой фазой пептидах пептидных матриц (455-луночный планшет с 3 мкл лунками). Пептидные матрицы осторожно встряхивают в растворе в течение 30-60 минут, полностью покрывая раствором. Наконец, пептидные матрицы интенсивно промывают избытком H<sub>2</sub>O и обрабатывают ультразвуком в буфере прерывания, содержащем 1% SDS/0,1% бета-меркаптоэтанол в PBS (pH 7,2) при 70°C в течение 30 минут, с последующей обработкой ультразвуком в H<sub>2</sub>O в течение еще 45 минут. Пептиды, несущие T3 CLIPS, были получены аналогичным образом, но с тремя цистеинами.

[0200] Различные наборы пептидов были синтезированы в соответствии со следующими конструкциями. Набор 1 содержал набор линейных пептидов, имеющих длину 15 аминокислот, полученных из целевой последовательности TIGIT человека со смещением в один остаток. Набор 2 содержал набор линейных пептидов из набора 1, но с остатками в положениях 10 и 11, замененными на Ala. Когда нативный Ala находился в любой позиции, его заменяли на Gly. Набор 3 содержал набор линейных пептидов из набора 1, который содержал остатки Cys. В этом наборе нативные Cys были заменены Cys-ацетамидометилом («Cys-асм»). Набор 4 содержал набор линейных пептидов, имеющих длину 17 аминокислот, полученных из целевой последовательности TIGIT человека со смещением в один остаток. В позициях 1 и 17 находились остатки Cys, использованные для создания петельных имитаторов с помощью mP2 CLIPS. Нативные Cys были заменены на Cys-асм. Набор 6 содержал набор линейных пептидов, имеющих длину 22 аминокислот, полученных из целевой последовательности TIGIT человека со смещением в один остаток. Остатки в положениях 11 и 12 были заменены мотивом «PG», в то время как остатки Cys были помещены в положения 1 и 22, чтобы создать ограниченную имитацию с mP2. Нативные остатки Cys были заменены на Cys-асм. Набор 7 содержал набор линейных пептидов, имеющих длину 27 аминокислот. В положениях 1-11 и 17-27 находились 11-мерные пептидные последовательности, полученные из последовательности-мишени и соединенные через линкер «GGSGG». Комбинации были сделаны на основе информации UniProt о дисульфидном мостике для TIGIT человека. Набор 8 включал набор комбинаторных пептидов, имеющих длину 33 аминокислоты. В положениях 2-16 и 18-32 находились 15-мерные пептиды, полученные из последовательности-мишени TIGIT человека. В позициях 1, 17 и 33 находились остатки Cys, использованные для создания прерывистых имитаторов с помощью T3 CLIPS.

[0201] Связывание антитела с каждым из синтезированных пептидов тестировали с помощью ИФА на основе пепскана. Пептидные матрицы инкубировали с раствором первичного антитела (в течение ночи при 4 °C). После промывки пептидные матрицы инкубировали с разведением 1/1000 козьего анти-человеческого конъюгата HRP (Southern Biotech) в течение одного часа при 25 °C. После промывания, добавляли субстрат пероксидазы 2,2'-азино-ди-3-этилбензтиазолинсульфонат (ABTS) и 20 мкл/мл 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Через час

измеряли развитие цвета. Развитие цвета определяли количественно с помощью устройства с зарядовой связью (CCD) – камеры и системы обработки изображений. Значения, полученные от CCD-камеры, колеблются от 0 до 3000 MAU, аналогично стандартному 96-луночному планшетному ELISA-ридеру.

[0202] Для проверки качества синтезированных пептидов параллельно синтезировали отдельный набор пептидов положительного и отрицательного контроля. Они были подвергнуты скринингу с коммерческими антителами 3C9 и 57,9 (Posthumus *et al.*, *J. Virol.*, 1990, 64:3304–3309).

[0203] Для клона 13, при тестировании в условиях высокой жесткости клон 13 слабо связывается с прерывистыми имитаторами эпитопа. Антитело также тестировали в условиях умеренной жесткости и наблюдали обнаруживаемое связывание антитела. Наибольшие интенсивности сигнала были зафиксированы с прерывистыми имитаторами эпитопов, содержащими участки  ${}_{68}\text{ICNADLGWHISPSFK}_{82}$  (SEQ ID NO:258),  ${}_{42}\text{ILQCHLSSTTAQV}_{54}$  (SEQ ID NO:259),  ${}_{108}\text{CIYHTYDPGTYTGRI}_{122}$  (SEQ ID NO:260). Дополнительное, более слабое связывание наблюдалось с пептидами, содержащими пептидный участок  ${}_{80}\text{SFKDRVAPGPG}_{90}$  (SEQ ID NO:261). Связывание антитела с имитаторами линейного и простого конформационного эпитопа, как правило, было ниже и наблюдалось только для мотивов  ${}_{68}\text{ICNADLGWHISPSFK}_{82}$  (SEQ ID NO:258),  ${}_{108}\text{CIYHTYDPGTYTGRI}_{122}$  (SEQ ID NO:260) и  ${}_{80}\text{SFKDRVAPGPG}_{90}$  (SEQ ID NO:261).

[0204] Для клона 25, при тестировании в условиях высокой жесткости клон 25 обнаруживал связанные пептиды из всех наборов. Наиболее сильное связывание наблюдалось с прерывистыми имитаторами эпитопа. Хотя связывание с пептидами, содержащими остатки в пределах участка  ${}_{68}\text{ICNADLGWHISPSFK}_{82}$  (SEQ ID NO:258), также наблюдалось в других наборах, связывание с пептидным участком  ${}_{50}\text{TTAQVTQ}_{56}$  (SEQ ID NO:262) наблюдалось только в сочетании с  ${}_{68}\text{ICNADLGWHISPSFK}_{82}$  (SEQ ID NO:258). Дополнительное, более слабое связывание также наблюдалось с пептидами, содержащими пептидный участок  ${}_{80}\text{SFKDRVAPGPG}_{90}$  (SEQ ID NO:263).

[0205] На основании данных результатов картирования эпитопов для клона 13 и клона 25 было выполнено тонкое картирование эпитопов клона 13 и клона 25 с использованием способов, описанных выше, с использованием следующих наборов пептидов. Набор 1 содержал библиотеку эпитопных мутантов по одному остатку на основе последовательности

CILQ2HLSSTTAQVTQCI2NADLGWHISPSFKC (SEQ ID NO:264). Остатки ADHIQRY (SEQ ID NO:265) подвергали замене. Положения 1, 17, 19, 30 и 33 не были заменены. Нативные остатки Cys были заменены на Cys-асн (обозначается как «2»). Набор 2 содержал библиотеку ходячих двойных Ala мутантов, полученных из последовательности CILQ2HLSSTTAQVTQCI2NADLGWHISPSFKC (SEQ ID NO:264). Позиции 1, 17 и 33 не были заменены. Нативные остатки Cys были заменены на Cys-асн. Набор 3 содержал библиотеку эпитопных мутантов по одному остатку на основе последовательности CKDRVAPGPGGLGLTLQCI2NADLGWHISPSFKC (SEQ ID NO:266). Остатки ADHIQRY (SEQ ID NO: 265) использовали для замены. Положения 1, 2, 17, 19, 30 и 33 не были заменены. Набор 4 содержал библиотеку ходячих двойных Ala мутантов, полученных из последовательности CKDRVAPGPGGLGLTLQCI2NADLGWHISPSFKC (SEQ ID NO:266). Позиции 1, 17 и 33 не были заменены.

[0206] Клон 13 тестировали с четырьмя сериями прерывистых эпитопных мутантов, полученных из пептидов CILQ2HLSSTTAQVTQCI2NADLGWHISPSFKC (SEQ ID NO:264) и CKDRVAPGPGGLGLTLQCI2NADLGWHISPSFKC (SEQ ID NO:266) в условиях высокой и умеренной жесткости. Анализ данных показал, что во всех случаях замены остатков  $_{81}FK_{82}$  либо единичными остатками Ala, либо двумя Ala приводили к нарушению связывания клона 13. Одиночные мутации других остатков прерывистых имитаторов эпитопа не оказывали радикальных эффектов на связывание. Напротив, мутанты с двойным Ala в эпитопе проявляли более выраженный эффект на связывание по сравнению с серией мутантов с одним остатком для соответствующих прерывистых имитаторов. Также было обнаружено, что двойные замены остатков на  $_{51}TAQVT_{55}$  (SEQ ID NO:267) в CILQ2HLSSTTAQVTQCI2NADLGWHISPSFKC (SEQ ID NO:264) заметно влияли на связывание клона 13. Интенсивности сигналов, зарегистрированных для клона 13 с имитаторами эпитопов, полученными из последовательности CKDRVAPGPGGLGLTLQCI2NADLGWHISPSFKC (SEQ ID NO:266), были ниже, чем интенсивности, зарегистрированные с CILQ2HLSSTTAQVTQCI2NADLGWHISPSFKC (SEQ ID NO:264). Кроме того, было установлено, что в дополнение к двойной замене на Ala в  $_{81}FK_{82}$  двойная замена на Ala в  $_{74}GWHI_{77}$  (SEQ ID NO:268) заметно снижает связывание клона 13. Кроме того, двойные мутации Ala в участке  $_{87}PGPGLGL_{93}$  (SEQ ID NO:269) несколько ослабили связывание.

[0207] Клон 25 тестировали с четырьмя сериями прерывистых

эпитопных мутантов, полученных из пептидов CILQ2HLSSTTAQVTQCI2NADLGWHISPSFKC (SEQ ID NO:264) и CKDRVAPGPGGLGLTLQCI2NADLGWHISPSFKC (SEQ ID NO:266) в условиях высокой и умеренной жесткости. Анализ данных, собранных из отдельных наборов эпитопных мутантов, показал, что единичные или двойные замены остатков  $_{81}\text{FK}_{82}$  резко влияли на связывание. Замена отдельных остатков в CILQ2HLSSTTAQVTQCI2NADLGWHISPSFKC (SEQ ID NO:264) и CKDRVAPGPGGLGLTLQCI2NADLGWHISPSFKC (SEQ ID NO:266) не вызывала заметного снижения интенсивности сигналов. Серия ходячих двойных Ala мутантов продемонстрировала более выраженное влияние на связывание клона 25 с имитатором. В дополнение к  $_{81}\text{FK}_{82}$  двойные замены на Ala остатков  $_{52}\text{AQ}_{53}$  и P79 также слегка влияли на связывание антитела с эпитопом, имитирующим CILQ2HLSSTTAQVTQCI2NADLGWHISPSFKC (SEQ ID NO:264). Анализ связывания клона 25 с серией двойных Ala мутантов, полученной из CKDRVAPGPGGLGLTLQCI2NADLGWHISPSFKC (SEQ ID NO:266), повторно подтвердил важность  $_{81}\text{FK}_{82}$ , но и также показал, что двойные замены на Ala остатков  $_{73}\text{LGW}_{75}$  и  $_{82}\text{KDRVA}_{86}$  (SEQ ID NO:270) умеренно влияют на связывание.

[0208] Таким образом, для моноклональных антител клона 13 и клона 25 было обнаружено, что остатки  $_{81}\text{FK}_{82}$  имеют решающее значение для связывания обоих антител с имитаторами эпитопа TIGIT. Для клона 13 также обнаружено, что остатки  $_{51}\text{TAQVT}_{55}$  (SEQ ID NO:267),  $_{74}\text{GWHI}_{77}$  (SEQ ID NO:268) и  $_{87}\text{PGPGLGL}_{93}$  (SEQ ID NO:269) способствуют связыванию. Для клона 25 также обнаружено, что остатки  $_{52}\text{AQ}_{53}$ ,  $_{73}\text{LGW}_{75}$ , P79, and,  $_{82}\text{KDRVA}_{86}$  (SEQ ID NO:270) способствуют связыванию.

Таблица 3. Неформальный список последовательностей

Название	SEQ ID NO	Последовательность
Клон 2 VH белок	1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDHYMDWVRQAPG KGLEWVGRTRNKANSYTTTEYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQ MNSLKTEDTAVYYCARGQYYYGSSSRGYYYMDVWGQGTITVTV SS
Клон 2 VH ДНК	2	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCT GGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACC TTCAGTGACCACTACATGGACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGG AAGGGGCTGGAGTGGGTTGGCCGTA TAGAAACAAGCTAAC AGTTACACCACAGAATACGCCGCTCTGTGAAAGGCAGATTC ACCATCTCAAGAGATGATTCAAAGAACTCACTGTATCTGCAA ATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACGGCGGTGTA C TACTGC GCCAGAGGCCAGTACTACTACGGCAGCAGCAGCAGAGGTTAC TACTACATGGACGTATGGGGCCAGGGAACAACCGTCAACCGTC TCCTCA

Клон 2 VH FR1	3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG
Клон 2 VH CDR1	4	FTFSDHYMD
Клон 2 VH FR2	5	WVRQAPGKGLEWVG
Клон 2 VH CDR2	6	RTRNKANSYTTEYAASVKG
Клон 2 VH FR3	7	RFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYC
Клон 2 VH CDR3	8	ARGQYYYGSSSRGYYYMDV
Клон 2 VH FR4	9	WGQGTTVTVSS
Клоны 2 и 2С VL белок	10	EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPG QAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYCQQAVPSPLTFGGGTKVEIK
Клон 2 VL ДНК	11	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCT CCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGT GTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGC CAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCC ACTGGCATCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACA GACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTT GCAGTGTATTACTGTCAGCAGGCCGTCCCCAGTCCTCTCACT TTTGGCGGAGGGACCAAGTTGAGATCAAA
Клон 2 VL FR1	12	EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSC
Клоны 2 и 2С VL CDR1	13	RASQSVSSSYLA
Клон 2 VL FR2	14	WYQQKPGQAPRLLIY
Клоны 2 и 2С VL CDR2	15	GASSRAT
Клон 2 VL FR3	16	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC
Клоны 2 и 2С VL CDR3	17	QQAVPSPLT
Клон 2 VL FR4	18	FGGGTKVEIK
Клон 3 VH белок	19	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDHYMDWVRQAPG KGLEWVGRTRNKANSYTTEYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQ MNSLKTEDTAVYYCARGQYYYGSSSRGYYYMDVWGQGTTVTV SS
Клон 3 VH ДНК	20	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCT GGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACC TTCAGTGACCACTACATGGACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGG AAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCGTACTAGAAACAAAGCTAAC AGTTACACCACAGAATACGCCGCTCTGTGAAAGGCAGATTC ACCATCTCAAGAGATGATTCAAAGAACTCACTGTATCTGCAA ATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACGGCGGTGTACTACTGC GCCAGAGGCCAGTACTACTACGGCAGCAGCAGCAGAGGTTAC TACTACATGGACGTATGGGGCCAGGGAACAACCGTCACCGTC

		TCCTCA
Клон 3 VH FR1	21	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG
Клон 3 VH CDR1	22	FTFSDHYMD
Клон 3 VH FR2	23	WVRQAPGKGLEWVG
Клон 3 VH CDR2	24	RTRNKANSYTTEYAASVKG
Клон 3 VH FR3	25	RFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYC
Клон 3 VH CDR3	26	ARGQYYYGSSSRGYYYMDV
Клон 3 VH FR4	27	WGQGTITVTVSS
Клон 3 VL Белок	28	EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSVRSSLAWYQQKPG QAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYCQQVGPPLTFGGGTKVEIK
Клон 3 VL ДНК	29	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCT CCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGT GTTAGGAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGC CAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCC ACTGGCATCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACA GACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTT GCAGTGTATTACTGTGAGCAGGTCGGACCCCCCTCACTTTT GGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAA
Клон 3 VL FR1	30	EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSC
Клон 3 VL CDR1	31	RASQSVRSSYLA
Клон 3 VL FR2	32	WYQQKPGQAPRLLIY
Клон 3 VL CDR2	33	GASSRAT
Клон 3 VL FR3	34	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC
Клон 3 VL CDR3	35	QQVGPPLT
Клон 3 VL FR4	36	FGGGTKVEIK
Клон 5 VH белок	37	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWVRQAPG KGLEWVSAISGSGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKGPYQDRAGMDVWGQGTITVTVSS
Клон 5 VH ДНК	38	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCT GGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACC TTTAGCACCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGG AAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGT AGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATC TCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAATGAAC AGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAAG GGCCCCAGATAACCAAGACAGGGCAGGAATGGACGTATGGGGC CAGGGAACAACCTGTCACCGTCTCCTCA

Клон 5 VH FR1	39	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG
Клон 5 VH CDR1	40	FTFSTYAMS
Клон 5 VH FR2	41	WVRQAPGKGLEWVS
Клон 5 VH CDR2	42	AISGSGGSTYYADSVKG
Клон 5 VH FR3	43	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
Клон 5 VH CDR3	44	AKGPRYQDRAGMDV
Клон 5 VH FR4	45	WGQGT TVTVSS
Клон 5 VL Белок	46	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA TYYCQQSLATPYTFGGG TKVEIK
Клон 5 VL ДНК	47	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCT GTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGC ATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAA GCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGT GGGGTCCCATCAAGGTT CAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGAT TTCCTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCA ACTTACTACTGTCAGCAAAGCCTCGCCACTCCTTACACTTTT GGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA
Клон 5 VL FR1	48	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC
Клон 5 VL CDR1	49	RASQSISSYLN
Клон 5 VL FR2	50	WYQQKPGKAPKLLIY
Клон 5 VL CDR2	51	AASSLQS
Клон 5 VL FR3	52	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
Клон 5 VL CDR3	53	QQSLATPYT
Клон 5 VL FR4	54	FGGGTKVEIK
Клон 13 VH белок	55	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAI SWVRQAPG QGLEWMGSIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELS SLRSED TAVYYCARGPSEV GAILGYVWFDPWGQGLTVTVSS
Клон 13 VH ДНК	56	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCT GGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACC TTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGA CAAGGGCTTGAGTGGATGGGAAGCATCATCCCTATCTTTGGT ACAGCAAAC TACGCACAGAAGTTCAGGGCAGAGTCACGATT ACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGC AGCCTGAGATCTGAGGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGA GGCCCTTCTGAAGTAGGAGCAATACTCGGATATGTATGGTTC GACCCATGGGGACAGGGTACATTGGTCACCGTCTCCTCA
Клон 13 VH	57	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASG

FR1		
Клон 13 VH CDR1	58	GTFSSYAIS
Клон 13 VH FR2	59	WVRQAPGQGLEWVG
Клон 13 VH CDR2	60	SIIPIFGTANYAQKFQG
Клон 13 VH FR3	61	RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDТАVYYC
Клоны 13 и 13A VH CDR3	62	ARGPSEVGAILGYVWFDP
Клон 13 VH FR4	63	WGQGLTVTVSS
Клоны 13, 13A, 13B, 13C и 13D VL Белок	64	DIVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLLSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQARRIPITFGGGTKVEIK
Клон 13 VL ДНК	65	GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCTCCTGCATAGTAATGGATAACAATATTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCATAATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAGGCAAGACGATCCCTATCACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA
Клон 13 VL FR1	66	DIVMTQSPLSLPVTTPGEPASISC
Клоны 13, 13A, 13B, 13C и 13D VL CDR1	67	RSSQSLLSNGYNYLD
Клон 13 VL FR2	68	WYLQKPGQSPQLLIY
Клоны 13, 13A, 13B, 13C и 13D VL CDR2	69	LGSNRAS
Клон 13 VL FR3	70	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
Клоны 13, 13A, 13B, 13C и 13D VL CDR3	71	MQARRIPIT
Клон 13 VL FR4	72	FGGGTKVEIK
Клон 14 VH Белок	73	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWVGSIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDТАVYYCARGPSEVGAILGYVWFDPWGQGLTVTVSS
Клон 14 VH ДНК	74	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGA

		CAAGGGCTTGAGTGGATGGGAAGCATCATCCCTATCTTTGGT ACAGCAAACACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATT ACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGC AGCCTGAGATCTGAGGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGA GGCCCTTCTGAAGTAGGAGCAATACTCGGATATGTATGGTTC GACCCATGGGGACAGGGTACATTGGTCACCGTCTCCTCA
Клон 14 VH FR1	75	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASG
Клон 14 VH CDR1	76	GTFSSYAIS
Клон 14 VH FR2	77	WVRQAPGQGLEWMG
Клон 14 VH CDR2	78	SIIPIFGTANYAQKFQG
Клон 14 VH FR3	79	RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDТАVYYC
Клон 14 VH CDR3	80	ARGPSEVGAILGYVWFDP
Клон 14 VH FR4	81	WGQGLTVTVSS
Клон 14 VL Белок	82	DIVMTQSPSLPVTTPGEPASISCRSSQSLLSHNGYNYLDWYL QKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVE AEDVGVYYCMQAKRLPLTFGGGTKVEIK
Клон 14 VL ДНК	83	GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACC CCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGC CTCCTGCATAGTAATGGATACAACTATTTGGATTGGTACCTG CAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGGGT TCTAATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGT GGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAG GCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAGGCAAACGA CTCCCTCTCACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA
Клон 14 VL FR1	84	DIVMTQSPSLPVTTPGEPASISC
Клон 14 VL CDR1	85	RSSQSLLSHNGYNYLD
Клон 14 VL FR2	86	WYLQKPGQSPQLLIY
Клон 14 VL CDR2	87	LGSNRAS
Клон 14 VL FR3	88	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
Клон 14 VL CDR3	89	MQAKRLPLT
Клон 14 VL FR4	90	FGGGTKVEIK
Клон 16 VH Белок	91	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPG QGLEWMGGIIPIFGTASYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELS SLRSEDТАVYYCARQSTWHKLYGTDVWGQTTVTVSS
Клон 16 VH ДНК	92	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCT GGGTCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACC TTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGA CAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGT

		ACAGCAAGCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATT ACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGC AGCCTGAGATCTGAGGACACGGCGGTGTACTACTGCGCAAGA CAGAGCACCTGGCACAAATTGTACGGAACGGACGTATGGGGC CAGGGAACAACCTGTCACCGTCTCCTCA
Клон 16 VH FR1	93	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASG
Клон 16 VH CDR1	94	GTFSSYAIS
Клон 16 VH FR2	95	WVRQAPGQGLEWMG
Клон 16 VH CDR2	96	GIIPIFGTASYAQKFQG
Клон 16 VH FR3	97	RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYC
Клон 16 VH CDR3	98	ARQSTWHKLYGTDV
Клон 16 VH FR4	99	WGQGTITVTVSS
Клоны 16, 16C, 16D и 16E VL Белок	100	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA TYYCQQGDSLPPFTFGGGTKVEIK
Клон 16 VL ДНК	101	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTCCGTGTCTGCATCT GTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCTGGGCGAGTCAGGGT ATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAA GCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGT GGGGTCCCATCAAGGTTGAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAT TTCATCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCA ACTTATTACTGTCAGCAGGGAGACAGTCTCCCTCCTACTTTT GGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAA
Клон 16 VL FR1	102	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITC
Клоны 16, 16C, 16D и 16E VL CDR1	103	RASQGISSWLA
Клон 16 VL FR2	104	WYQQKPGKAPKLLIY
Клоны 16, 16C, 16D и 16E VL CDR2	105	AASSLQS
Клон 16 VL FR3	106	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
Клоны 16, 16C, 16D и 16E VL CDR3	107	QQGDSLPPFT
Клон 16 VL FR4	108	FGGGTKVEIK
Клон 18 VH	109	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTSYMSWVRQAPG

Белок		QGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDТАVYYCАRВRYGYADGMDVWGQTTVTVSS
Клон 18 VH ДНК	110	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGCATCTGGАТАСACC TTCACCAGCTACTATATGTCATGGGTGCGACAGGCCCTGGA CAAGGGCTTGAGTGGATGGGAATAATCAACCCTAGTGGTGGT AGCACAAGCTACGCACAGAAGTTCAGGGCAGAGTCACCATG ACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGGAGCTGAGC AGCCTGAGATCTGAGGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGA GTGAGGTACGGATACGCAGACGGAATGGACGTATGGGGCCAG GGAACAАCTGTCACCGTCTCCTCA
Клон 18 VH FR1	111	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG
Клон 18 VH CDR1	112	YTFTSYYMS
Клон 18 VH FR2	113	WVRQAPGQGLEWMG
Клон 18 VH CDR2	114	IINPSGGSTSYAQKFQG
Клон 18 VH FR3	115	RVTMTRDTSTSTVYMEЛSSLRSEDТАVYYC
Клон 18 VH CDR3	116	ARВRYGYADGMDV
Клон 18 VH FR4	117	WGQTTVTVSS
Клон 18 VL Белок	118	DIQMTQSPSSLSASVGDРVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQVYHLPFTFGGGTKVEIK
Клон 18 VL ДНК	119	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAA GCCCCTAAGCTCCTGATCTATGGTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGAT TTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCA ACTTACTACTGTСAGCAAGTATACCACCTCCCTTTCACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA
Клон 18 VL FR1	120	DIQMTQSPSSLSASVGDРVTITC
Клон 18 VL CDR1	121	RASQSISSYLN
Клон 18 VL FR2	122	WYQQKPGKAPKLLIY
Клон 18 VL CDR2	123	GASSLQS
Клон 18 VL FR3	124	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC
Клон 18 VL CDR3	125	QQVYHLPFT
Клон 18 VL FR4	126	FGGGTKVEIK
Клон 21 VH Белок	127	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGSTYYNPSLKSРVTISVDTSKNQFSLKL

		SSVTAADTAVYYCARDPLYQDAPFDYWGQGLVTVSS
Клон 21 VH ДНК	128	CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCT TCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCC ATCAGCAGTAGTAGTTACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCC CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAGTATCTATTATAGT GGGAGCACCTACTACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACC ATATCCGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTG AGTTCTGTGACCGCCGCAGACACGGCGGTGTACTACTGCGCC AGAGATCCTTTGTACCAAGACGCTCCCTTCGACTATTGGGGA CAGGGTACATTGGTCACCGTCTCCTCA
Клон 21 VH FR1	129	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSG
Клон 21 VH CDR1	130	GSISSSSYWG
Клон 21 VH FR2	131	WIRQPPGKLEWIG
Клон 21 VH CDR2	132	SIYYSGSTYYNPSLKS
Клон 21 VH FR3	133	RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYC
Клон 21 VH CDR3	134	ARDPLYQDAPFDY
Клон 21 VH FR4	135	WGQGLVTVSS
Клон 21 VL Белок	136	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQ APRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFA VYYCQQRANFPTFGGGTKVEIK
Клон 21 VL ДНК	137	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCT CCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGT GTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAG GCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACT GGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAC TTCCTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCA GTTTATTACTGTCAGCAGAGAGCCAACTTCCCTACTTTTGGC GGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA
Клон 21 VL FR1	138	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC
Клон 21 VL CDR1	139	RASQSVSSYLA
Клон 21 VL FR2	140	WYQQKPGQAPRLLIY
Клон 21 VL CDR2	141	DASNRAT
Клон 21 VL FR3	142	GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYC
Клон 21 VL CDR3	143	QQRANFPT
Клон 21 VL FR4	144	FGGGTKVEIK
Клон 22 VH Белок	145	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGYSISSGYYWAWIRQPP GKLEWIGSIYHSGSTYYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLS SVTAADTAVYYCARQGYYYGSSGSVDFDLWGRGTLVTVSS

Клон 22 VH ДНК	146	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCT TCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTCTGGTTACTCC ATCAGCAGTGGTTACTACTGGGCTTGGATCCGGCAGCCCCCA GGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAGTATCTATCATAGTGGG AGCACCTACTACAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGTCACCATA TCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGT TCTGTGACCGCCGACACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGG CAGGGATACTACTACGGCAGCAGCGGCAGTGTAGACTTCGAC CTATGGGGGAGAGGTACCTTGGTCACCGTCTCCTCA
Клон 22 VH FR1	147	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSG
Клон 22 VH CDR1	148	YSISSGYIWA
Клон 22 VH FR2	149	WIRQPPGKGLEWIG
Клон 22 VH CDR2	150	SIYHSGSTYYNPSLKS
Клон 22 VH FR3	151	RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYC
Клон 22 VH CDR3	152	ARQGYIYGSSGSDVDFDL
Клон 22 VH FR4	153	WGRGTLVTVSS
Клон 22 VL Белок	154	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISWLAWYQQKPGK APKLLIYAASNLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFA TYYCQQANSLPPWTFGGGTKVEIK
Клон 22 VL ДНК	155	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTCCGTGTCTGCATCT GTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTGCGGGCAGTCAGGGT ATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAA GCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAATTTGCAAAGT GGGGTCCCATCAAGGTTTACGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAT TTCATCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCA ACTTATTACTGTCAACAGGCAAATAGTCTCCCTCCTTGGACT TTTGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAA
Клон 22 VL FR1	156	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITC
Клон 22 VL CDR1	157	RASQGISWLA
Клон 22 VL FR2	158	WYQQKPGKAPKLLIY
Клон 22 VL CDR2	159	AASNLQS
Клон 22 VL FR3	160	GVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYC
Клон 22 VL CDR3	161	QQANSLPPWT
Клон 22 VL FR4	162	FGGGTKVEIK
Клон 25 VH Белок	163	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTYAI SWVRQAPG QGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELR SLRSDDTAVYYCARDLSSFWSGDVLGAFDIWGQGTMTVSS
Клон 25 VH	164	CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCT

ДНК		GGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACC TTTACCAGCTATGCCATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGA CAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTTACAATGGT AACACAAACTATGCACAGAAGCTCCAGGGCAGAGTCACCATG ACCACAGACACATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGG AGCCTGAGATCTGACGACACGGCGGTGTACTACTGCGCAAGG GATTTGTCTAGCTTCTGGAGCGGAGACGTGTTAGGAGCCTTC GACATATGGGGTCAGGGTACAATGGTCACCGTCTCCTCA
Клон 25 VH FR1	165	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASG
Клоны 25 и 25A VH CDR1	166	YTFTSYAIS
Клон 25 VH FR2	167	WVRQAPGQGLEWMG
Клоны 25 и 25E VH CDR2	168	WISAYNGNTNYAQKLOG
Клон 25 VH FR3	169	RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYC
Клоны 25, 25A и 25B VH CDR3	170	ARDLSSFWSGDVVGAFDI
Клон 25 VH FR4	171	WGQGTMTVTVSS
Клоны 25, 25A, 25B, 25C, 25D и 25E VL Белок	172	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA TYYCQQSVPPRTFGGGTKVEIK
Клон 25 VL ДНК	173	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCT GTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGC ATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAA GCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGT GGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGAT TTCATCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCA ACTTACTACTGTCAGCAAAGCGTCCCCCCCAGGACTTTTGGC GGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA
Клон 25 VL FR1	174	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC
Клоны 25, 25A, 25B, 25C, 25D и 25E VL CDR1	175	RASQSISSYLN
Клон 25 VL FR2	176	WYQQKPGKAPKLLIY
Клоны 25, 25A, 25B, 25C, 25D и 25E VL CDR2	177	AASSLQS
Клон 25 VL	178	GVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC

FR3		
Клоны 25, 25А, 25В, 25С, 25D и 25Е VL CDR3	179	QQSVPPRT
Клон 25 VL FR4	180	FGGGTKVEIK
Клон 27 VH Белок	181	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYAISWVRQAPG QGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELR SLRSDDTAVYYCARDLSSFWSGDVVGAFDIWGQGMVTVSS
Клон 27 VH ДНК	182	CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCT GGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACC TTTACCAGCTATGCCATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGA CAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTTACAATGGT AACACAAACTATGCACAGAAGCTCCAGGGCAGAGTCACCATG ACCACAGACACATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGG AGCCTGAGATCTGACGACACGGCGGTGTACTACTGCGCAAGG GATTTGTCTAGCTTCTGGAGCGGAGACGTGTTAGGAGCCTTC GACATATGGGGTCAGGGTACAATGGTCACCGTCTCCTCA
Клон 27 VH FR1	183	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG
Клон 27 VH CDR1	184	YTFTSYAIS
Клон 27 VH FR2	185	WVRQAPGQGLEWMG
Клон 27 VH CDR2	186	WISAYNGNTNYAQKLG
Клон 27 VH FR3	187	RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYC
Клон 27 VH CDR3	188	ARDLSSFWSGDVVGAFDI
Клон 27 VH FR4	189	WGQGMVTVSS
Клон 27 VL Белок	190	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQ APRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDF VYYCQQHANHITFGGGTKVEIK
Клон 27 VL ДНК	191	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCT CCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGT GTTAGCAGCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAG GCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACT GGTATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAG TTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCA GTTTATTACTGTCAGCAGCACGCCAATCACATCACTTTTGGC GGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA
Клон 27 VL FR1	192	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC
Клон 27 VL CDR1	193	RASQSVSSNLA
Клон 27 VL FR2	194	WYQQKPGQAPRLLIY
Клон 27 VL	195	GASTRAT

CDR2		
Клон 27 VL FR3	196	GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC
Клон 27 VL CDR3	197	QQHANHIT
Клон 27 VL FR4	198	FGGGTKVEIK
Клон 54 VH Белок	199	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWVRQAPG QGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMEIS SLRSEDТАVYYCARASDSYGVLYYGMDVWGQTTVTVSS
Клон 54 VH ДНК	200	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCT GGGGCCTCAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGCATCTGGATACACC TTCACCAGCTACTATATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGA CAAGGGCTTGAGTGGATGGGAATAATCAACCCТАGTGGTGGT AGCACAACTACGCACAGAAGTTCAGGGCAGAGTCACCATG ACCAGGGACACGTCCACGAGCACAGTCTACATGGAGCTGAGC AGCCTGAGATCTGAGGACACGGCGGTGTACTACTGCGCTAGG GCATCTGACTCCTACGGAGTGGGCCTCTACTACGGAATGGAC GTATGGGGCCAGGGAACAАCTGTCACCGTCTCCTCA
Клон 54 VH FR1	201	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG
Клон 54 VH CDR1	202	YTFTSYMH
Клон 54 VH FR2	203	WVRQAPGQGLEWMG
Клон 54 VH CDR2	204	IINPSGGSTSYAQKFQG
Клон 54 VH FR3	205	RVTMTRDTSTSTVYMEISLRSЕDTAVYYC
Клон 54 VH CDR3	206	ARASDSYGVLYYGMDV
Клон 54 VH FR4	207	WGQTTVTVSS
Клон 54 VL Белок	208	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVRSSYLAWYQQKPG QAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTI SRLEPEDF AVYYCQQYYVSPITFGGGTKVEIK
Клон 54 VL ДНК	209	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCT CCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGT GTTAGGAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGC CAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCC ACTGGCATCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACA GACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTT GCAGTGTATTACTGTCAGCAGTACTACGTCAGTCCTCTCACT TTTGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA
Клон 54 VL FR1	210	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSC
Клон 54 VL CDR1	211	RASQSVRSSYLA
Клон 54 VL FR2	212	WYQQKPGQAPRLLIY
Клон 54 VL CDR2	213	GASSRAT

Клон 54 VL FR3	214	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC
Клон 54 VL CDR3	215	QQYYVSPLT
Клон 54 VL FR4	216	FGGGTKVEIK
Последовательность кДНК TIGIT человека (регистрационный номер GenBank NM_173799. 3)	217	CGTCCTATCTGCAGTCGGCTACTTTCAGTGGCAGAAGAGGCC ACATCTGCTTCCTGTAGGCCCTCTGGGCAGAAGCATGCGCTG GTGTCTCCTCCTGATCTGGGCCAGGGGCTGAGGCAGGCTCC CCTCGCCTCAGGAATGATGACAGGCACAATAGAAACAACGGG GAACATTTCTGCAGAGAAAGGTGGCTCTATCATCTTACAATG TCACCTCTCCTCCACCACGGCACAAGTGACCCAGGTCAACTG GGAGCAGCAGGACCAGCTTCTGGCCATTTGTAATGCTGACTT GGGGTGGCACATCTCCCCATCCTTCAAGGATCGAGTGGCCCC AGGTCCCGGCCTGGGCCTCACCTCCAGTTCGCTGACCGTGAA CGATACAGGGGAGTACTTCTGCATCTATCACACCTACCCTGA TGGGACGTACACTGGGAGAATCTTCTGGAGGTCCTAGAAAG CTCAGTGGCTGAGCACGGTGCCAGGTTCCAGATTCCATTGCT TGGAGCCATGGCCGCGACGCTGGTGGTCATCTGCACAGCAGT CATCGTGGTGGTCGCGTTGACTAGAAAGAAGAAAGCCCTCAG AATCCATTCTGTGGAAGGTGACCTCAGGAGAAAATCAGCTGG ACAGGAGGAATGGAGCCCCAGTGCTCCCTCACCCCCAGGAAG CTGTGTCCAGGCAGAAGCTGCACCTGCTGGGCTCTGTGGAGA GCAGCGGGGAGAGGACTGTGCCGAGCTGCATGACTACTTCAA TGTCTGAGTTACAGAAGCCTGGGTAAGTGCAGCTTCTTAC AGAGACTGGTTAGCAACCAGAGGCATCTTCTGGAAGATACAC TTTTGTCTTTGCTATTATAGATGAATATATAAGCAGCTGTAC TCTCCATCAGTGCTGCGTGTGTGTGTGTGTGTGTATGTGTGT GTGTGTTTCAAGTTGAGTGAATAAATGTCATCCTCTTCTCCATC TTCATTTCTTGGCCTTTTTCGTTCTATTCCATTTTGCATTAT GGCAGGCCTAGGGTGAAGTAAAGTGGATCTTGATCATAAATGC AAAATTAATAAATATCTTGACCTGGTTTTAAATCTGGCAGTT TGAGCAGATCCTATGTCTCTGAGAGACACATTCCTCATAATG GCCAGCATTTTGGGCTACAAGGTTTTGTGGTTGATGATGAGG ATGGCATGACTGCAGAGCCATCCTCATCTCATTTTTTTCACGT CATTTTTCAGTAACTTTCACTCATTCAAAGGCAGGTTATAAGT AAGTCCTGGTAGCAGCCTCTATGGGGAGATTTGAGAGTGAAT AAATCTTGGTATCTGCCCTCAAGAACTTACAGTTAAATGGGG AGACAATGTTGTCATGAAAAGGTATTATAGTAAGGAGAGAAG GAGACATACACAGGCCTTCAGGAAGAGACGACAGTTTGGGGT GAGGTAGTTGGCATAGGCTTATCTGTGATGAAGTGGCCTGGG AGCACCAAGGGGATGTTGAGGCTAGTCTGGGAGGAGCAGGAG TTTTGTCTAGGGAACCTGTAGGAAATCTTGGAGCTGAAAGT CCCACAAAGAAGGCCCTGGCACCAAGGGAGTCAGCAAACCTC AGATTTTATTCTCTGGGCAGGCATTTCAAGTTTCTTTTGCT GTGACATACTCATCCATTAGACAGCCTGATACAGGCCTGTAG CCTCTTCCGGCCGTGTGTGCTGGGGAAGCCCCAGGAAACGCA CATGCCACACAGGGAGCCAAGTCGTAGCATTTGGGCCTTGA TCTACCTTTTCTGCATCAATACACTCTTGGAGCCTTTGAAAAA AGAACGTTTTCCCACTAAAAAGAAAATGTGGATTTTTTAAATA GGGACTCTTCCTAGGGGAAAAAGGGGGGCTGGGAGTGATAGA GGGTTTTAAAAAATAAACACCTTCAAACCTTCTTTCGAACC CTTTTATTCACCTCCCTGACGACTTTGTGCTGGGGTTGGGGTA

		<p>ACTGAACCGCTTATTTCTGTTTAATTGCATTCAGGCTGGATC  TTAGAAGACTTTTATCCTTCCACCATCTCTCTCAGAGGAATG  AGCGGGGAGGTTGGATTTACTGGTGACTGATTTTCTTTCATG  GGCCAAGGAAGTAAAGAGAATGTGAAGCAAGGTTGTGTCTT  GCGCATGGTTAAAAATAAAGCATTGTCCTGCTTCCCTAAGACT  TAGACTGGGGTTGACAAATGTTTTAGCAACAAGACAATTCAA  CTATTTCTCCTAGGATTTTATTATTATTATTTTTTCACTTT  TCTACCAAAATGGGTTACATAGGAAGAATGAACTGAAATCTGT  CCAGAGCTCCAAGTCCTTTGGAAGAAAGATTAGATGAACGTA  AAAATGTTGTTGTTTGTCTGTGGCAGTTTACAGCATTTTTCTT  GCAAAATTAGTGCAAATCTGTTGAAATAGAACAACAAATCAC  AAATTGGAAGTGAAGTAAAATGTAATGACGAAAAGGGAGTAG  TGTTTTGATTTGGAGGAGGTGTATATTCGGCAGAGGTTGGAC  TGAGAGTTGGGTGTTATTTAACATAATTATGGTAATTGGGAA  ACATTTATAACACTATTGGGATGGTGATAAAAATACAAAAGG  GCCTATAGATGTTAGAAATGGGTCAGGTTACTGAAATGGGAT  TCAATTTGAAAAAATTTTTTTAAATAGAAGTCACTGAACTA  GATTCTCCTCTGAGAACCAGAGAAGACCATTTTCATAGTTGGA  TTCTGGAGACATGCGCTATCCACCACGTAGCCACTTCCAC  ATGTGGCCATCAACCACTTAAGATGGGGTTAGTTTAAATCAA  GATGTGCTGTTATAATTGGTATAAGCATAAAAATCACACTAGA  TTCTGGAGATTTAA  TATGAATAATAAGAATACTATTTTCAGTAGTTTTGGTATATTG  TGTGTCAAAAATGATAATATTTTGGATGTATTGGGTGAAATA  AAATATTAACATTAAAAAAAAAA</p>
TIGIT белок человека (регистрац ионный номер GenBank NP_776160. 2)	218	<p>MRWCLLLIWAQGLRQAPLASGMMTGTIETTGNISAEKGGSI I  LQCHLSSSTAQVTQVNWEQQDQLLAI CNADLGWHI SPSFKDR  VAPGPGLGLTLQSLTVNDTGEYFCIYHTYPDGTYTGRIFLEV  LESSVAEHGARFQI PLLGAMAATLVVICTAVIVVVALTRKKK  ALRIHSVEGLRRKSAGQEEWSPSAPSPPGSCVQAEAAPAGL  CGEQRGEDCAELHDYFNVLSYRSLGNCSEFFTETG</p>
Cynomolgus макака белок TIGIT	219	<p>MAFLVAPPMQFVYLLKTLVFNMFVAKPGFSETVFSHRLSFT  VLSAVGYFRWQKRPHLLPVSPLGRSMRWCLFLIWAQGLRQAP  LASGMMTGTIETTGNISAKKGGSVILQCHLSSSTAQVTQVNW  EQHDHSLLAIRNAELGWHIYPAFKDRVAPGPGLGLTLQSLTM  NDTGEYFCTYHTYPDGTYRGRIFLEVLESSVAEHSARFQIPL  LGAMAMMLVVICIAVIVVVLARKKSLRIHSVESGLQRKST  GQEEQIPSAAPSPPGSCVQAEAAPAGLGCGEQQGDDCAELHDYF  NVLSYRSLGSCSEFFTETG</p>
Мышиный белок TIGIT	220	<p>MHWLWVWVQGLIQAFLATGATAGTIDTKRNISAEEGGSV  ILQCHFSSDTAEVTQVDWKQQDQLLAIYSVDLGWHVASVFS  RVVPGPSLGLTFQSLTMNDTGEYFCTYHTYPGGIYKGRIFLK  VQESSVAQFQTAPLGGTMAAVLGLICLMVTGVTVLARKKSI  R MHSIESGLGRTEAEPQEWNLRLSLSPGPSVQQTAPAGPCGE  QAEDDYADPQYFNVLSYRSLESFIAVSKTG</p>
Клон 2C VH CDR1	221	FTFTDYMD
Клон 2C VH CDR2	222	RTRNKVNSYYTEYAASVKG
Клон 2C VH	223	ARGQYYYGSDRRGYYYMDV

CDR3		
Клоны 13А, 13С и 13D VH CDR1	224	GTFLLSSAIS
Клон 13А VH CDR2	225	SLIPYFGTANYAQKFQG
Клон 13В VH CDR1	226	GTFSAWAIS
Клоны 13В и 13D VH CDR2	227	SIIPYFGKANYAQKFQG
Клон 13В VH CDR3	228	ARGPSEVSGILGYVWFDP
Клон 13С VH CDR2	229	SIIPLFGKANYAQKFQG
Клоны 13С и 13D VH CDR3	230	ARGPSEVKGILGYVWFDP
Клон 16С VH CDR1	231	GTFREY AIS
Клон 16С VH CDR2	232	GIHPIFGTARYAQKFQG
Клоны 16D и 16Е VH CDR1	233	GTFSDYPIS
Клоны 16D и 16Е VH CDR2	234	GIIPIVGGANYAQKFQG
Клон 16С VH CDR3	235	TRQSTWHKLYGTDV
Клон 16D VH CDR3	236	TRQSTWHKLF GTDV
Клон 16Е VH CDR3	237	ARQSTWHKVY GTDV
Клон 25А VH CDR2	238	WISAYNGNTKYAQKLQG
Клоны 25В, 25С и 25D VH CDR1	239	YTFTSYPIG
Клоны 25В, 25С и 25D VH CDR2	240	WISSYNGNTNYAQKLQG
Клон 25С VH CDR3	241	ARGASSFWSGDVLGAFDI
Клон 25D VH CDR3	242	ARDLKSFWSGDVLGAFDI
Клон 25Е VH CDR1	243	YTFTSYAIA
Клон 25Е VH CDR3	244	ARSGSSFWSGDVLGAFDI
Клон 2С VH	245	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFTDYMDWVRQAPG KGLEWVGRTRNKVNSYYTEYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQ

		MNSLKTEDTAVYYCARGQYYYGSDRRGYYYMDVWGQGTTVTVSS
Клон 13A VH	246	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFLSSAISWVRQAPG QGLEWMGSLIPYFGTANYA QKFQGRVTITADESTSTAYMELS SLRSED TAVYYCARGPSEV GAILGYVWFDPWGQGTTLTVTVSS
Клон 13B VH	247	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSAWAISWVRQAPG QGLEWMGSIIPYFGKANYA QKFQGRVTITADESTSTAYMELS SLRSED TAVYYCARGPSEV SGILGYVWFDPWGQGTTLTVTVSS
Клон 13C VH	248	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFLSSAISWVRQAPG QGLEWMGSIIPLFGKANYA QKFQGRVTITADESTSTAYMELS SLRSED TAVYYCARGPSEV KILGYVWFDPWGQGTTLTVTVSS
Клон 13D VH	249	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFLSSAISWVRQAPG QGLEWMGSIIPYFGKANYA QKFQGRVTITADESTSTAYMELS SLRSED TAVYYCARGPSEV KILGYVWFDPWGQGTTLTVTVSS
Клон 16C VH	250	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFREYAISWVRQAPG QGLEWMGGIHPIFGTARYA QKFQGRVTITADESTSTAYMELS SLRSED TAVYYCTRQSTW HKLYGTDVWGQGTTVTVTVSS
Клон 16D VH	251	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSDYPI SWVRQAPG QGLEWMGGIIPIVGGANYA QKFQGRVTITADESTSTAYMELS SLRSED TAVYYCTRQSTW HKLFGTDVWGQGTTVTVTVSS
Клон 16E VH	252	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSDYPI SWVRQAPG QGLEWMGGIIPIVGGANYA QKFQGRVTITADESTSTAYMELS SLRSED TAVYYCARQSTW HKVYGT DVWGQGTTVTVTVSS
Клон 25A VH	253	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTSYAISWVRQAPG QGLEWMGWISAYNGNTKYA QKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELR SLRSDD TAVYYCARDLSS FWSGDV LGAFDIWGQGTMTVTVSS
Клон 25B VH	254	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTSYPIGWVRQAPG QGLEWMGWISSYNGNTNYA QKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELR SLRSDD TAVYYCARDLSS FWSGDV LGAFDIWGQGTMTVTVSS
Клон 25C VH	255	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTSYPIGWVRQAPG QGLEWMGWISSYNGNTNYA QKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELR SLRSDD TAVYYCARGASS FWSGDV LGAFDIWGQGTMTVTVSS
Клон 25D VH	256	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTSYPIGWVRQAPG QGLEWMGWISSYNGNTNYA QKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELR SLRSDD TAVYYCARDLKS FWSGDV LGAFDIWGQGTMTVTVSS
Клон 25E VH	257	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTSYAIAWVRQAPG QGLEWMGWISAYNGNTNYA QKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELR SLRSDD TAVYYCARSGSS FWSGDV LGAFDIWGQGTMTVTVSS
Эпитоп hTIGIT 68- 82	258	ICNADLGWHISPSFK

[0209] Несмотря на то, что вышеизложенное изобретение для ясности и понимания было описано более подробно с помощью иллюстрации и примера, специалисту в данной области техники будет понятно, что определенные изменения и модификации могут быть реализованы в рамках прилагаемой формулы изобретения. Конкретные варианты осуществления, описанные в данном документе, предлагаются только в качестве примера и никоим образом не предназначены для ограничения. Предполагается, что описание и примеры будут рассматриваться только как примерные, причем

истинный объем и сущность изобретения указаны в следующей формуле изобретения.

[0210] Все публикации, патенты, патентные заявки или другие документы, процитированные в данном документе, настоящим включены в качестве ссылки во всей их полноте для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент, заявка на патент или другой документ были индивидуально указаны для включения посредством ссылки для всех целей.

1. Изолированное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые связываются с TIGIT человека (Т-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и ITIM), в котором антитело или его антигенсвязывающая часть имеют аффинность связывания ( $K_D$ ) с TIGIT человека менее чем 5 нМ.

2. Изолированное антитело по п. 1, в котором антитело или его антигенсвязывающая часть имеет  $K_D$  для TIGIT человека менее чем 1 нМ.

3. Изолированное антитело по п. 1, в котором антитело или его антигенсвязывающая часть имеет  $K_D$  для TIGIT человека менее чем 100 пМ.

4. Изолированное антитело по любому из пп. 1-3, в котором антитело или его антигенсвязывающая часть проявляют перекрестную реактивность с TIGIT яванского макака и/или TIGIT мыши.

5. Изолированное антитело по п. 4, в котором антитело или его антигенсвязывающая часть проявляют перекрестную реактивность с TIGIT яванского макака и TIGIT мыши.

6. Изолированное антитело по любому из пп. 1-5, в котором антитело или его антигенсвязывающая часть блокирует связывание CD155 с TIGIT.

7. Изолированное антитело по любому из пп. 1-5, в котором антитело или его антигенсвязывающая часть блокирует связывание CD112 с TIGIT.

8. Изолированное антитело по любому из пп. 1-5, в котором антитело или его антигенсвязывающая часть блокирует связывание CD155 и CD112 с TIGIT.

9. Изолированное антитело по любому из пп. 1-8, в котором антитело или его антигенсвязывающая часть связывается с эпитопом TIGIT человека, который содержит одно или оба аминокислотных положения 81 и 82.

10. Изолированное антитело по п. 9, в котором эпитоп

содержит Phe в положении 81.

11. Изолированное антитело по п. 8, в котором эпитоп содержит Lys или Ser в положении 82.

12. Изолированное антитело по любому из пп. 9-11, в котором эпитоп содержит Phe в положении 81 и Lys или Ser в положении 82.

13. Изолированное антитело по п. 12, в котором эпитоп содержит Phe81 и Lys82.

14. Изолированное антитело по любому из пп. 9-13, в котором эпитоп представляет собой прерывистый эпитоп.

15. Изолированное антитело по любому из пп. 9-14, в котором антитело или его антигенсвязывающая часть связывается с эпитопом TIGIT человека, который дополнительно содержит одно или более аминокислотных положений 51, 52, 53, 54, 55, 73, 74, 75, 76, 77, 79, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92 или 93.

16. Изолированное антитело по п. 15, в котором эпитоп дополнительно содержит один или более аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из Thr51, Ala52, Gln53, Val54, Thr55, Leu73, Gly74, Trp75, His76, Ile77, Pro79, Asp83, Arg84, Val85, Ala86, Pro87, Gly88, Pro89, Gly90, Leu91, Gly92 и Leu93.

17. Изолированное антитело по п. 16, в котором эпитоп содержит аминокислотные остатки Thr51, Ala52, Gln53, Val54, Thr55, Gly74, Trp75, His76, Ile77, Phe81, Lys82, Pro87, Gly88, Pro89, Gly90, Leu91, Gly92 и Leu93.

18. Изолированное антитело по п. 16, в котором эпитоп содержит аминокислотные остатки Ala52, Gln53, Leu73, Gly74, Trp75, Pro79, Phe81, Lys82, Asp83, Arg84, Val85 и Ala86.

19. Изолированное антитело по любому из пп. 9-18, в котором эпитоп содержит последовательность ICNADLGWHISPSFK.

20. Изолированное антитело по любому из пп. 1-19, в котором антитело или его антигенсвязывающая часть содержит одно или более из:

(a) CDR1 тяжелой цепи, содержащую последовательность любой из SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:94, SEQ ID NO:112, SEQ ID NO:130, SEQ ID NO:148, SEQ ID NO:166, SEQ ID NO:184, SEQ ID NO:202, SEQ ID NO:221, SEQ ID NO:224, SEQ ID NO:226, SEQ ID NO:231, SEQ ID NO:233, SEQ ID NO:239 или SEQ ID NO:243;

(b) CDR2 тяжелой цепи, содержащей последовательность любой из SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:114, SEQ ID NO:132, SEQ ID

NO:150, SEQ ID NO:168, SEQ ID NO:186, SEQ ID NO:204, SEQ ID NO:222, SEQ ID NO:225, SEQ ID NO:227, SEQ ID NO:229, SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:234, SEQ ID NO:238 или SEQ ID NO:240;

(с) CDR3 тяжелой цепи, содержащей последовательность любой из SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:116, SEQ ID NO:134, SEQ ID NO:152, SEQ ID NO:170, SEQ ID NO:188, SEQ ID NO:206, SEQ ID NO:223, SEQ ID NO:228, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:235, SEQ ID NO:236, SEQ ID NO:237, SEQ ID NO:241, SEQ ID NO:242 или SEQ ID NO:244;

(d) CDR1 легкой цепи, содержащей последовательность любой из SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:121, SEQ ID NO:139, SEQ ID NO:157, SEQ ID NO:175, SEQ ID NO:193 или SEQ ID NO:211;

(e) CDR2 легкой цепи, содержащей последовательность любой из SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:87, SEQ ID NO:105, SEQ ID NO:123, SEQ ID NO:141, SEQ ID NO:159, SEQ ID NO:177, SEQ ID NO:195 или SEQ ID NO:213; или

(f) CDR3 легкой цепи, содержащей последовательность любой из SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:89, SEQ ID NO:107, SEQ ID NO:125, SEQ ID NO:143, SEQ ID NO:161, SEQ ID NO:179, SEQ ID NO:197 или SEQ ID NO:215.

21. Изолированное антитело по п. 20, в котором антитело или его антигенсвязывающая часть содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR и CDR3 легкой цепи, содержащие последовательности:

(a) SEQ ID NO: 4, 6, 8, 13, 15 и 17 соответственно; или

(b) SEQ ID NO: 22, 24, 26, 31, 33 и 35 соответственно; или

(c) SEQ ID NO: 40, 42, 44, 49, 51 и 53 соответственно; или

(d) SEQ ID NO: 58, 60, 62, 67, 69 и 71 соответственно; или

(e) SEQ ID NO: 76, 78, 80, 85, 87 и 89 соответственно; или

(f) SEQ ID NO: 94, 96, 98, 103, 105 и 107 соответственно;

ИЛИ

(g) SEQ ID NO: 112, 114, 116, 121, 123 и 125 соответственно; или

(h) SEQ ID NO: 130, 132, 134, 139, 141 и 143 соответственно; или

(i) SEQ ID NO: 148, 150, 152, 157, 159 и 161 соответственно; или

(j) SEQ ID NO: 166, 168, 170, 175, 177 и 179

соответственно; или

(k) SEQ ID NO: 184, 186, 188, 193, 195 и 197

соответственно; или

(l) SEQ ID NO: 202, 204, 206, 211, 213 и 215

соответственно; или

(m) SEQ ID NO: 221, 222, 223, 13, 15 и 17 соответственно;

или

(n) SEQ ID NO: 224, 225, 62, 67, 69 и 71 соответственно;

или

(o) SEQ ID NO: 226, 227, 228, 67, 69 и 71 соответственно;

или

(p) SEQ ID NO: 224, 229, 230, 67, 69 и 71 соответственно;

или

(q) SEQ ID NO: 224, 227, 230, 67, 69 и 71 соответственно;

или

(r) SEQ ID NO: 231, 232, 235, 103, 105 и 107

соответственно; или

(s) SEQ ID NO: 233, 234, 236, 103, 105 и 107

соответственно; или

(t) SEQ ID NO: 233, 234, 237, 103, 105 и 107

соответственно; или

(u) SEQ ID NO: 166, 238, 170, 175, 177 и 179

соответственно; или

(v) SEQ ID NO: 239, 240, 170, 175, 177 и 179

соответственно; или

(w) SEQ ID NO: 239, 240, 241, 175, 177 и 179

соответственно; или

(x) SEQ ID NO: 239, 240, 242, 175, 177 и 179

соответственно; или

(y) SEQ ID NO: 243, 168, 244, 175, 177 и 179

соответственно.

22. Изолированное антитело по любому из пп. 1-21, в котором антитело или его антигенсвязывающая часть содержит:

(a) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 245, SEQ ID NO: 246, SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 248, SEQ ID NO: 249, SEQ ID NO: 250, SEQ ID

NO: 251, SEQ ID NO: 252, SEQ ID NO: 253, SEQ ID NO: 254, SEQ ID NO: 255, SEQ ID NO: 256 или SEQ ID NO: 257; и/или

(b) вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:136, SEQ ID NO:154, SEQ ID NO:172, SEQ ID NO:190 или SEQ ID NO:208.

23. Изолированное антитело по п. 22, в котором антитело или его антигенсвязывающая часть содержит:

(a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 245, и вариабельную область легкой цепи содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 10; или

(b) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 19, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 28; или

(c) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 37, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 46; или

(d) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 246, SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 248 или SEQ ID NO: 249 и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 64; или

(e) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 73, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную

последовательности SEQ ID NO: 82; или

(f) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 250, SEQ ID NO: 251 или SEQ ID NO: 252 и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 100; или

(g) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 109, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 118; или

(h) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 127, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 136; или

(i) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 145, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO 154; или

(j) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 253, SEQ ID NO: 254, SEQ ID NO: 255, SEQ ID NO: 256 или SEQ ID NO: 257 и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 172; или

(k) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 181, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 190; или

(l) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую

аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 199, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 208.

24. Изолированное антитело по любому из пп. 1-23, в котором антитело или его антигенсвязывающая часть проявляют синергизм с антителом к PD1 или антителом к PD-L1.

25. Изолированное антитело или его антигенсвязывающая часть, которое связывается с TIGIT человека, в котором антитело или его антигенсвязывающая часть связывается с эпитопом TIGIT человека, который содержит аминокислотные положения 81 и 82.

26. Изолированное антитело по п. 25, в котором эпитоп содержит Phe в положении 81 и/или Lys или Ser в положении 82.

27. Изолированное антитело по п. 26, в котором эпитоп содержит Phe81 и Lys82.

28. Изолированное антитело по любому из пп. 25-27, в котором эпитоп представляет собой прерывистый эпитоп.

29. Изолированное антитело по любому из пп. 25-28, в котором антитело или его антигенсвязывающая часть связывается с эпитопом TIGIT человека, который дополнительно содержит одно или более аминокислотных положений 51, 52, 53, 54, 55, 73, 74, 75, 76, 77, 79, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92 или 93.

30. Изолированное антитело по п. 29, в котором эпитоп дополнительно содержит один или более аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из Thr51, Ala52, Gln53, Val54, Thr55, Leu73, Gly74, Trp75, His76, Ile77, Pro79, Asp83, Arg84, Val85, Ala86, Pro87, Gly88, Pro89, Gly90, Leu91, Gly92 и Leu93.

31. Изолированное антитело по п. 30, в котором эпитоп содержит аминокислотные остатки Thr51, Ala52, Gln53, Val54, Thr55, Gly74, Trp75, His76, Ile77, Phe81, Lys82, Pro87, Gly88, Pro89, Gly90, Leu91, Gly92 и Leu93.

32. Изолированное антитело по п. 30, в котором эпитоп содержит аминокислотные остатки Ala52, Gln53, Leu73, Gly74, Trp75, Pro79, Phe81, Lys82, Asp83, Arg84, Val85 и Ala86.

33. Изолированное антитело по любому из пп. 25-32, в котором эпитоп содержит последовательность ICNADLGWHISPSFK.

34. Изолированное антитело по любому из пп. 25-32, в котором антитело или его антигенсвязывающая часть содержит одно или более из:

(a) CDR1 тяжелой цепи, содержащую последовательность любой из SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:94, SEQ ID NO:112, SEQ ID NO:130, SEQ ID NO:148, SEQ ID NO:166, SEQ ID NO:184, SEQ ID NO:202, SEQ ID NO:221, SEQ ID NO:224, SEQ ID NO:226, SEQ ID NO:231, SEQ ID NO:233, SEQ ID NO:239 или SEQ ID NO:243;

(b) CDR2 тяжелой цепи, содержащей последовательность любой из SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:114, SEQ ID NO:132, SEQ ID NO:150, SEQ ID NO:168, SEQ ID NO:186, SEQ ID NO:204, SEQ ID NO:222, SEQ ID NO:225, SEQ ID NO:227, SEQ ID NO:229, SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:234, SEQ ID NO:238 или SEQ ID NO:240;

(c) CDR3 тяжелой цепи, содержащей последовательность любой из SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:116, SEQ ID NO:134, SEQ ID NO:152, SEQ ID NO:170, SEQ ID NO:188, SEQ ID NO:206, SEQ ID NO:223, SEQ ID NO:228, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:235, SEQ ID NO:236, SEQ ID NO:237, SEQ ID NO:241, SEQ ID NO:242 или SEQ ID NO:244;

(d) CDR1 легкой цепи, содержащей последовательность любой из SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:121, SEQ ID NO:139, SEQ ID NO:157, SEQ ID NO:175, SEQ ID NO:193 или SEQ ID NO:211;

(e) CDR2 легкой цепи, содержащей последовательность любой из SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:87, SEQ ID NO:105, SEQ ID NO:123, SEQ ID NO:141, SEQ ID NO:159, SEQ ID NO:177, SEQ ID NO:195 или SEQ ID NO:213; или

(f) CDR3 легкой цепи, содержащей последовательность любой из SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:89, SEQ ID NO:107, SEQ ID NO:125, SEQ ID NO:143, SEQ ID NO:161, SEQ ID NO:179, SEQ ID NO:197 или SEQ ID NO:215.

35. Изолированное антитело по п. 34, в котором антитело или его антигенсвязывающая часть содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR и CDR3 легкой цепи, содержащие последовательности:

(a) SEQ ID NO: 4, 6, 8, 13, 15 и 17 соответственно; или

(b) SEQ ID NO: 22, 24, 26, 31, 33 и 35 соответственно; или

(c) SEQ ID NO: 40, 42, 44, 49, 51 и 53 соответственно; или

(d) SEQ ID NO: 58, 60, 62, 67, 69 и 71 соответственно; или

(e) SEQ ID NO: 76, 78, 80, 85, 87 и 89 соответственно; или

- (f) SEQ ID NO: 94, 96, 98, 103, 105 и 107 соответственно;  
ИЛИ
- (g) SEQ ID NO: 112, 114, 116, 121, 123 и 125  
соответственно; ИЛИ
- (h) SEQ ID NO: 130, 132, 134, 139, 141 и 143  
соответственно; ИЛИ
- (i) SEQ ID NO: 148, 150, 152, 157, 159 и 161  
соответственно; ИЛИ
- (j) SEQ ID NO: 166, 168, 170, 175, 177 и 179  
соответственно; ИЛИ
- (k) SEQ ID NO: 184, 186, 188, 193, 195 и 197  
соответственно; ИЛИ
- (l) SEQ ID NO: 202, 204, 206, 211, 213 и 215  
соответственно; ИЛИ
- (m) SEQ ID NO: 221, 222, 223, 13, 15 и 17 соответственно;  
ИЛИ
- (n) SEQ ID NO: 224, 225, 62, 67, 69 и 71 соответственно;  
ИЛИ
- (o) SEQ ID NO: 226, 227, 228, 67, 69 и 71 соответственно;  
ИЛИ
- (p) SEQ ID NO: 224, 229, 230, 67, 69 и 71 соответственно;  
ИЛИ
- (q) SEQ ID NO: 224, 227, 230, 67, 69 и 71 соответственно;  
ИЛИ
- (r) SEQ ID NO: 231, 232, 235, 103, 105 и 107  
соответственно; ИЛИ
- (s) SEQ ID NO: 233, 234, 236, 103, 105 и 107  
соответственно; ИЛИ
- (t) SEQ ID NO: 233, 234, 237, 103, 105 и 107  
соответственно; ИЛИ
- (u) SEQ ID NO: 166, 238, 170, 175, 177 и 179  
соответственно; ИЛИ
- (v) SEQ ID NO: 239, 240, 170, 175, 177 и 179  
соответственно; ИЛИ
- (w) SEQ ID NO: 239, 240, 241, 175, 177 и 179  
соответственно; ИЛИ
- (x) SEQ ID NO: 239, 240, 242, 175, 177 и 179  
соответственно; ИЛИ
- (y) SEQ ID NO: 243, 168, 244, 175, 177 и 179  
соответственно.

36. Изолированное антитело по п. 34, в котором антитело или его антигенсвязывающая часть содержит:

(а) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 245, SEQ ID NO: 246, SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 248, SEQ ID NO: 249, SEQ ID NO: 250, SEQ ID NO: 251, SEQ ID NO: 252, SEQ ID NO: 253, SEQ ID NO: 254, SEQ ID NO: 255, SEQ ID NO: 256 или SEQ ID NO: 257; и/или

(б) переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:46, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:118, SEQ ID NO:136, SEQ ID NO:154, SEQ ID NO:172, SEQ ID NO:190 или SEQ ID NO:208.

37. Изолированное антитело по п. 36, в котором антитело или его антигенсвязывающая часть содержит:

(а) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 245, и переменную область легкой цепи содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 10; или

(б) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 19, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 28; или

(с) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 37, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 46; или

(д) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO: 55, SEQ ID

NO: 246, SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 248 или SEQ ID NO: 249 и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 64; или

(e) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 73, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 82; или

(f) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 250, SEQ ID NO: 251 или SEQ ID NO: 252 и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 100; или

(g) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 109, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 118; или

(h) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 127, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 136; или

(i) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 145, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO 154; или

(j) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из последовательностей SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 253, SEQ ID NO: 254, SEQ ID NO: 255, SEQ ID NO: 256 или SEQ ID NO: 257 и переменную область легкой цепи, содержащую

аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 172; или

(к) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 181, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 190; или

(л) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 199, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 208.

38. Изолированное антитело по любому из пп. 1-37, в котором антитело представляет собой моноклональное антитело.

39. Изолированное антитело по любому из пп. 1-38, в котором антитело представляет собой гуманизированное антитело.

40. Изолированное антитело по любому из пп. 1-38, в котором антитело представляет собой полностью человеческое антитело.

41. Изолированное антитело по любому из пп. 1-38, в котором антитело представляет собой химерное антитело.

42. Изолированное антитело по любому из пп. 1-38, в котором антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab, F(ab')<sub>2</sub>, scFv или двухвалентный scFv.

43. Фармацевтическая композиция, содержащая изолированное антитело по любому из пп. 1-42 и фармацевтически приемлемый носитель.

44. Биспецифическое антитело, содержащее антитело по любому из пп. 1-42.

45. Конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий антитело по любому из пп. 1-42.

46. Изолированный полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело по любому из пп. 1-42.

47. Изолированный полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело или его антигенсвязывающую часть, которая связывается с TIGIT человека, в котором изолированный полинуклеотид содержит:

(а) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:92,

SEQ ID NO:110, SEQ ID NO:128, SEQ ID NO:146, SEQ ID NO:164, SEQ ID NO:182 или SEQ ID NO:200; и/или

(b) нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:119, SEQ ID NO:137, SEQ ID NO:155, SEQ ID NO:173, SEQ ID NO:191 или SEQ ID NO:209.

48. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 46 или по п. 47.

49. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по п. 46 или п. 47, или вектор по п. 48.

50. Способ получения антитела, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 49 в условиях, подходящих для получения антитела.

51. Набор, содержащий:

изолированное антитело по любому из пп. 1-42, фармацевтическую композицию по п. 43; и

иммуноонкологический агент.

52. Набор по п. 51, в котором иммуноонкологический агент представляет собой ингибитор пути PD-1.

53. Набор по п. 52, в котором ингибитор пути PD-1 представляет собой антитело к PD1 или антитело к PD-L1.

54. Набор по п. 51, в котором иммуноонкологический агент представляет собой антагонист или ингибитор коингибитора T-клеток.

55. Набор по п. 51, в котором иммуноонкологический агент представляет собой агонист коактиватора T-клеток.

56. Набор по п. 51, в котором иммуноонкологический агент представляет собой иммуностимулирующий цитокин.

57. Способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту терапевтического количества изолированного антитела по любому из пп. 1-42, фармацевтической композиции по п. 43, биспецифического антитела по п. 44 или конъюгата антитело-лекарственное средство по п. 45.

58. Способ по п. 57, в котором рак представляет собой рак, имеющий повышенную экспрессию CD112 или CD155.

59. Способ по п. 57, в котором рак представляет собой рак, обогащенный T-клетками или натуральными киллерами (NK), которые экспрессируют TIGIT.

60. Способ по любому из пп. 57-59, в котором рак представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак матки, рак шейки матки, рак яичника, рак простаты, рак яичка,

рак пищевода, рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак толстой кишки, рак почки, рак головы и шеи, рак легких, рак желудка, рак половых клеток, рак кости, рак печени, рак щитовидной железы, рак кожи, новообразование центральной нервной системы, лимфому, лейкоз, миелому или саркому.

61. Способ по п. 60, в котором рак представляет собой лимфому или лейкоз.

62. Способ по любому из пп. 57-61, дополнительно включающий введение субъекту терапевтического количества иммуноонкологического агента.

63. Способ по п. 62, в котором иммуноонкологический агент представляет собой ингибитор пути PD-1.

64. Способ по п. 63, в котором ингибитор пути PD-1 представляет собой антитело к PD1 или антитело к PD-L1.

65. Способ по п. 62, в котором иммуноонкологический агент представляет собой антагонист или ингибитор коингибитора T-клеток.

66. Способ по п. 62, в котором иммуноонкологический агент представляет собой агонист коактиватора T-клеток.

67. Способ по п. 62, в котором иммуноонкологический агент представляет собой иммуностимулирующий цитокин.

68. Способ по любому из пп. 62-67, в котором изолированное антитело, фармацевтическую композицию, биспецифическое антитело или конъюгат антитело-лекарственное средство вводят одновременно с иммуноонкологическим агентом.

69. Способ по любому из пп. 62-67, в котором изолированное антитело, фармацевтическую композицию, биспецифическое антитело или конъюгат антитело-лекарственное средство вводят последовательно с иммуноонкологическим агентом.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Изолированное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые связываются с TIGIT человека (T-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и ITIM), где антитело или его антигенсвязывающая часть содержит:

(a) CDR1 тяжелой цепи, содержащую последовательность любой из SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:94, SEQ ID NO:112, SEQ ID NO:130, SEQ ID NO:148, SEQ ID NO:166, SEQ ID NO:184, SEQ ID NO:202, SEQ ID NO:221, SEQ ID NO:224, SEQ ID NO:226, SEQ ID NO:231, SEQ ID NO:233, SEQ ID NO:239 или SEQ ID NO:243;

(b) CDR2 тяжелой цепи, содержащей последовательность любой из SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:114, SEQ ID NO:132, SEQ ID NO:150, SEQ ID NO:168, SEQ ID NO:186, SEQ ID NO:204, SEQ ID NO:222, SEQ ID NO:225, SEQ ID NO:227, SEQ ID NO:229, SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:234, SEQ ID NO:238 или SEQ ID NO:240;

(c) CDR3 тяжелой цепи, содержащей последовательность любой из SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:116, SEQ ID NO:134, SEQ ID NO:152, SEQ ID NO:170, SEQ ID NO:188, SEQ ID NO:206, SEQ ID NO:223, SEQ ID NO:228, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:235, SEQ ID NO:236, SEQ ID NO:237, SEQ ID NO:241, SEQ ID NO:242 или SEQ ID NO:244;

(d) CDR1 легкой цепи, содержащей последовательность любой из SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:121, SEQ ID NO:139, SEQ ID NO:157, SEQ ID NO:175, SEQ ID NO:193 или SEQ ID NO:211;

(e) CDR2 легкой цепи, содержащей последовательность любой из SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:87, SEQ ID NO:105, SEQ ID NO:123, SEQ ID NO:141, SEQ ID NO:159, SEQ ID NO:177, SEQ ID NO:195 или SEQ ID NO:213; или

(f) CDR3 легкой цепи, содержащей последовательность любой из SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:89, SEQ ID NO:107, SEQ ID NO:125, SEQ ID NO:143, SEQ ID NO:161, SEQ ID NO:179, SEQ ID NO:197 или SEQ ID NO:215.

2. Фармацевтическая композиция, содержащая изолированное антитело или его антигенсвязывающую часть по п. 1 и фармацевтически приемлемый носитель.

3. Биспецифическое антитело, содержащее антитело или его

антигенсвязывающую часть по п. 1.

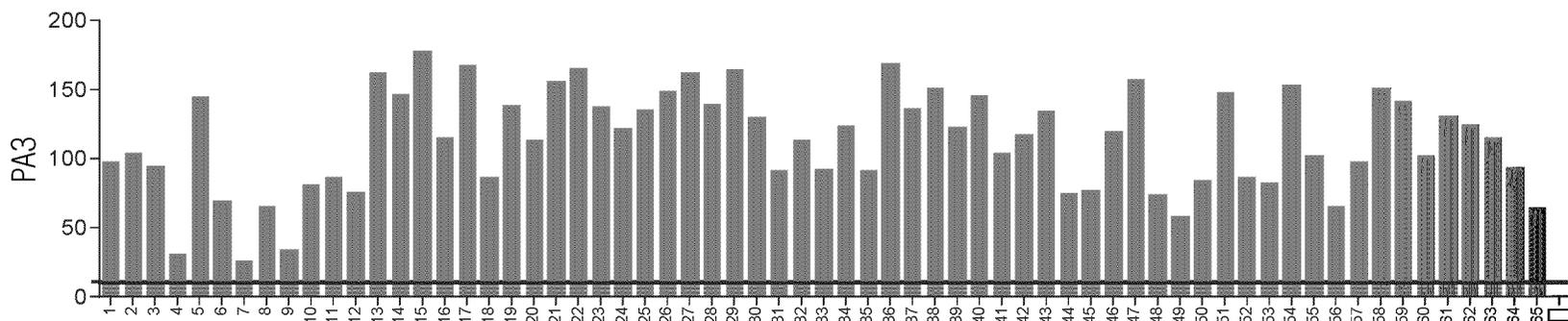
4. Конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий антитело или его антигенсвязывающую часть по п. 1.

5. Изолированный полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело или его антигенсвязывающую часть по п. 1.

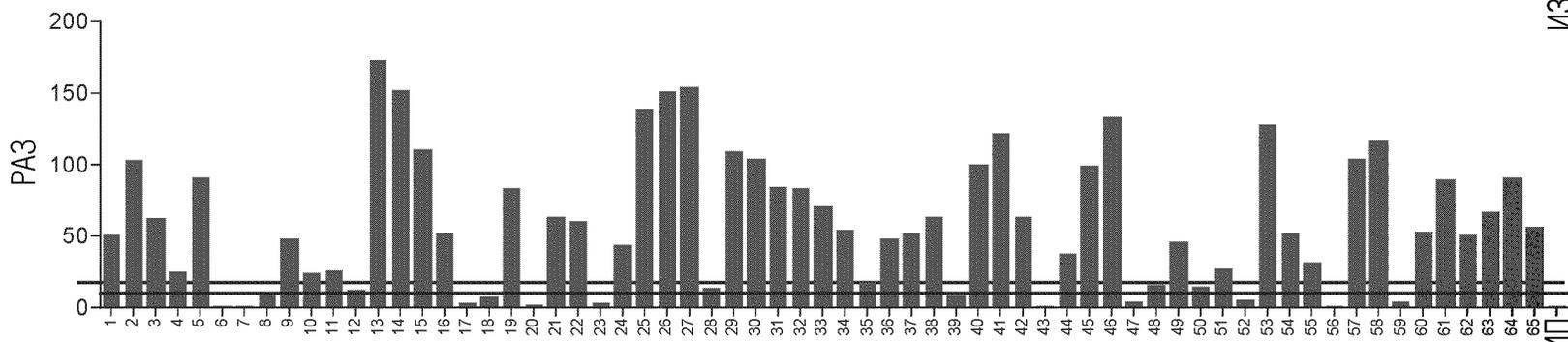
По доверенности

ФИГ. 1

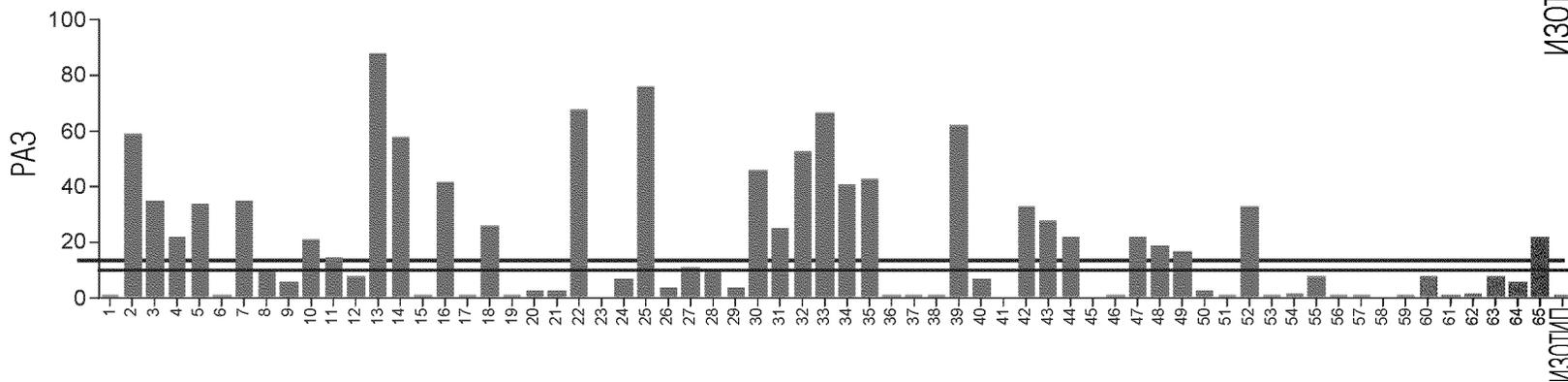
КЛЕТОЧНАЯ  
ЛИНИЯ 293  
TIGIT ЧЕЛОВЕ-  
КА



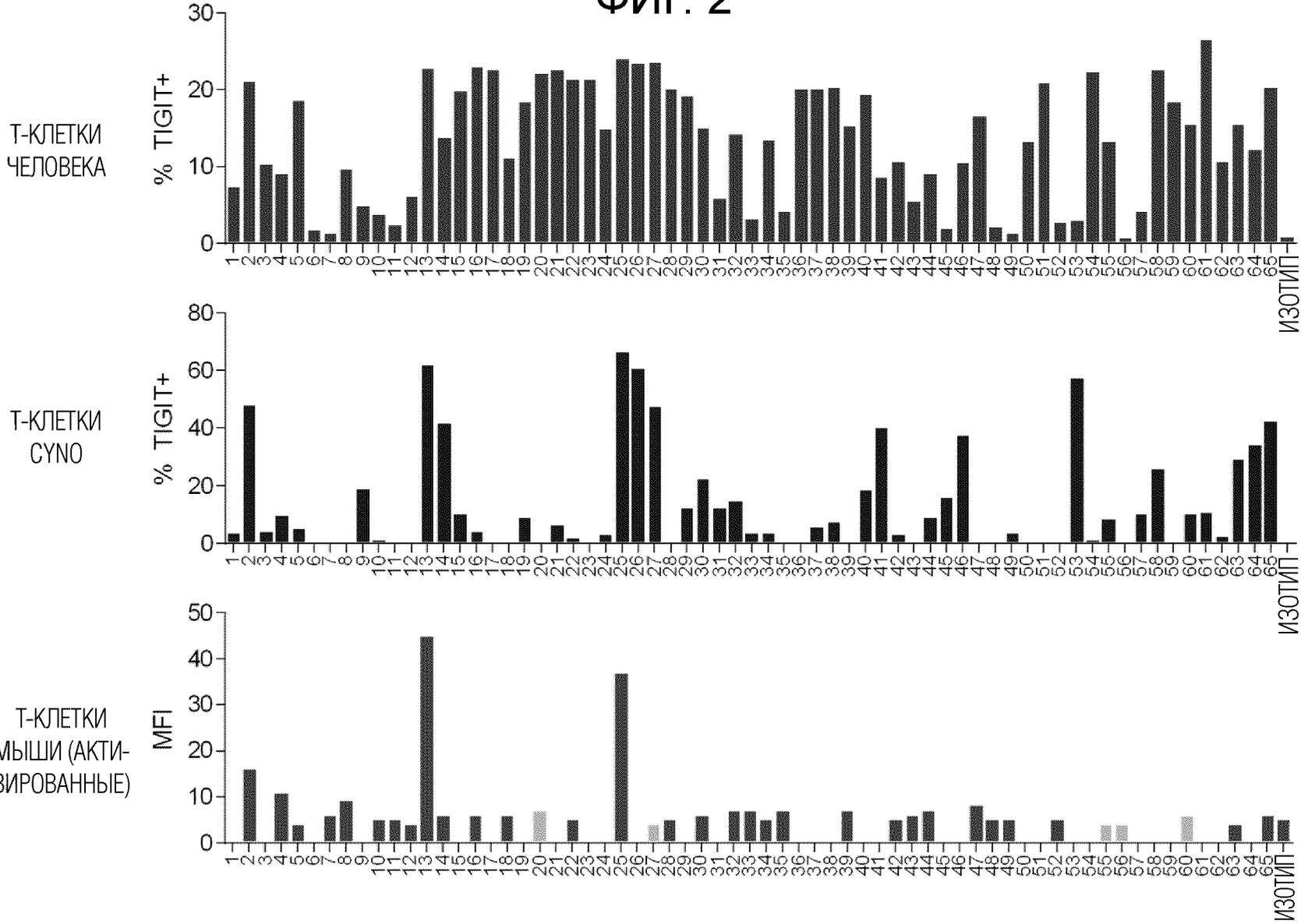
КЛЕТОЧНАЯ  
ЛИНИЯ 293  
TIGIT СУНО



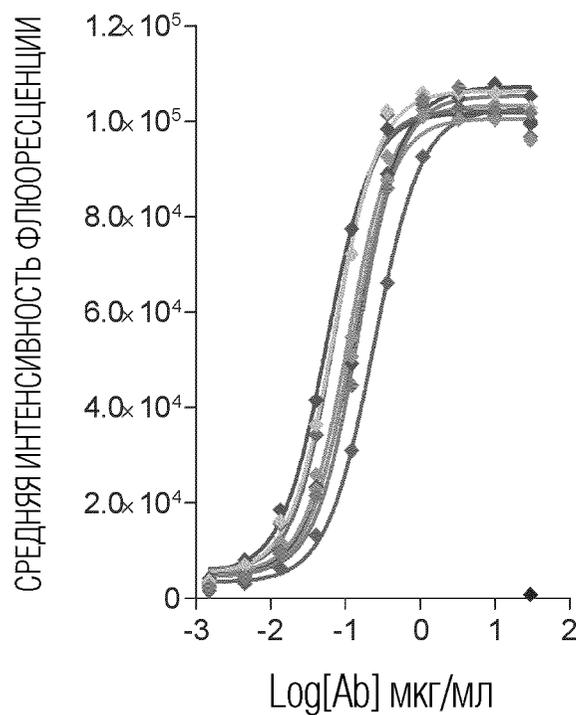
КЛЕТОЧНАЯ  
ЛИНИЯ 293  
TIGIT МЫШИ



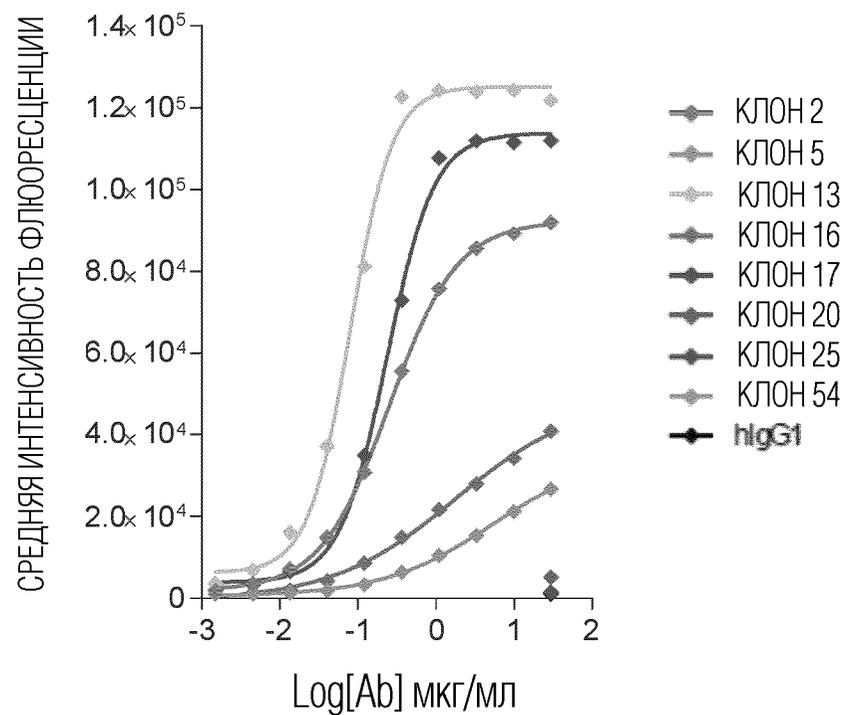
ФИГ. 2



ФИГ. 3А

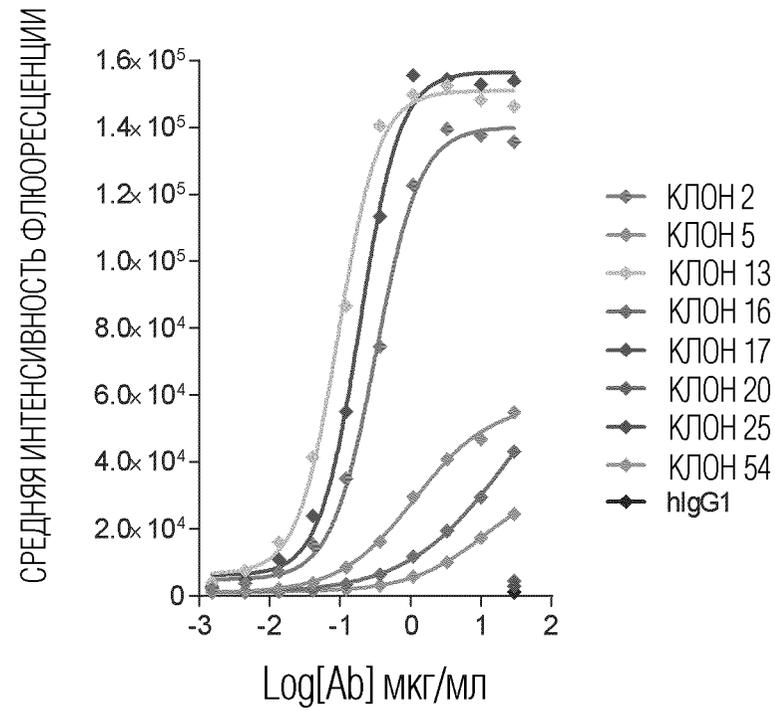


ФИГ. 3В



- КЛОН 2
- КЛОН 5
- КЛОН 13
- КЛОН 16
- КЛОН 17
- КЛОН 20
- КЛОН 25
- КЛОН 54
- hIgG1

ФИГ. 3С

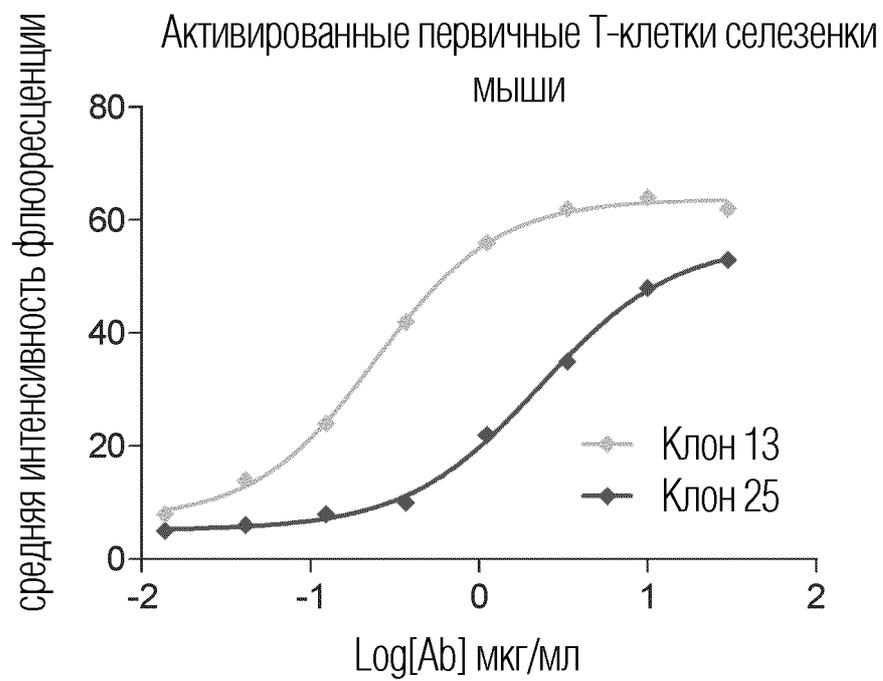


ФИГ. 3D

EC50s (мкг/мл)

	КЛОН 2	КЛОН 5	КЛОН 13	КЛОН 16	КЛОН 17	КЛОН 20	КЛОН 25	КЛОН 54
ЧЕЛОВЕК	0.15	0.12	0.07	0.07	0.06	0.24	0.14	0.11
МЫШЬ	0.25	5.39	0.08	0.08			0.24	
суно	0.32	1.17	0.10	0.10			0.19	11.44

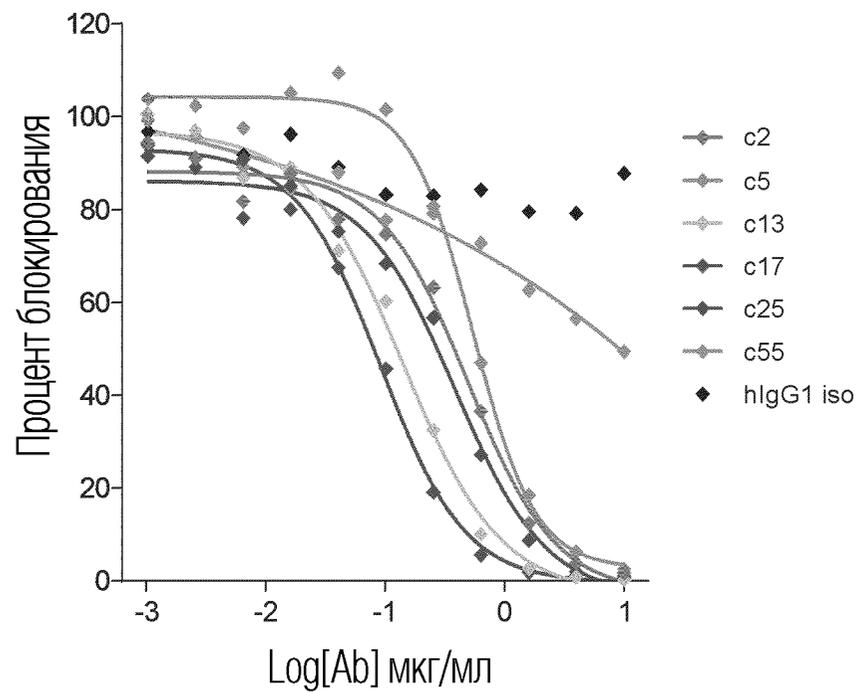
ФИГ. 4



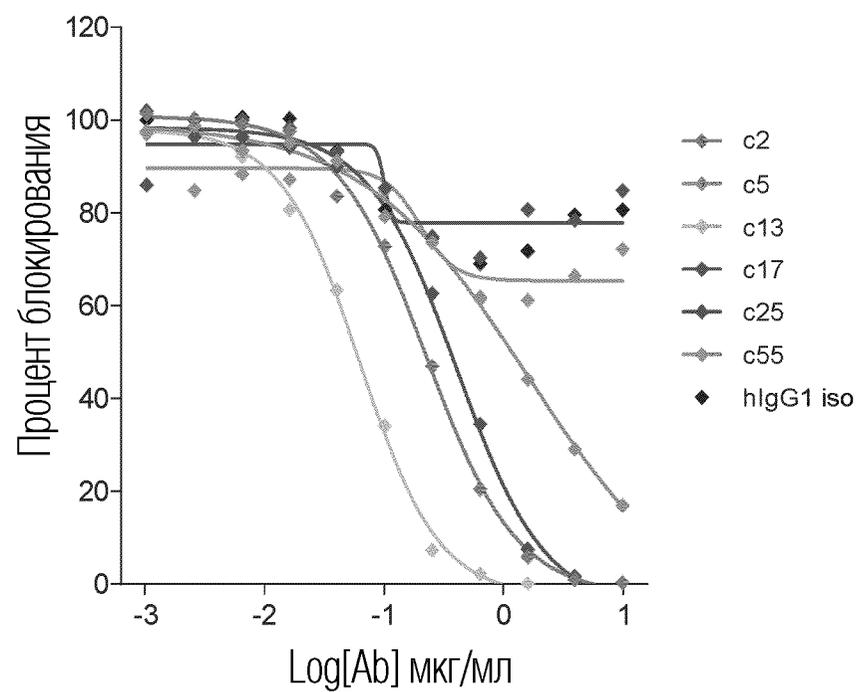
Клон 13 EC50 = 0,24 мкг/мл

Клон 25 EC50 = 2,28 мкг/мл

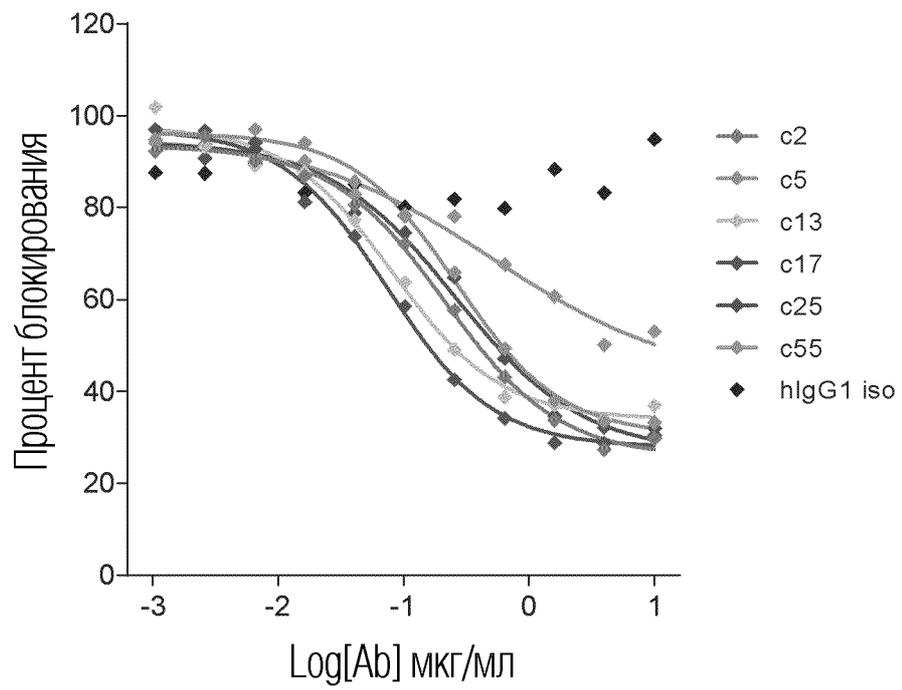
ФИГ. 5А



ФИГ. 5В

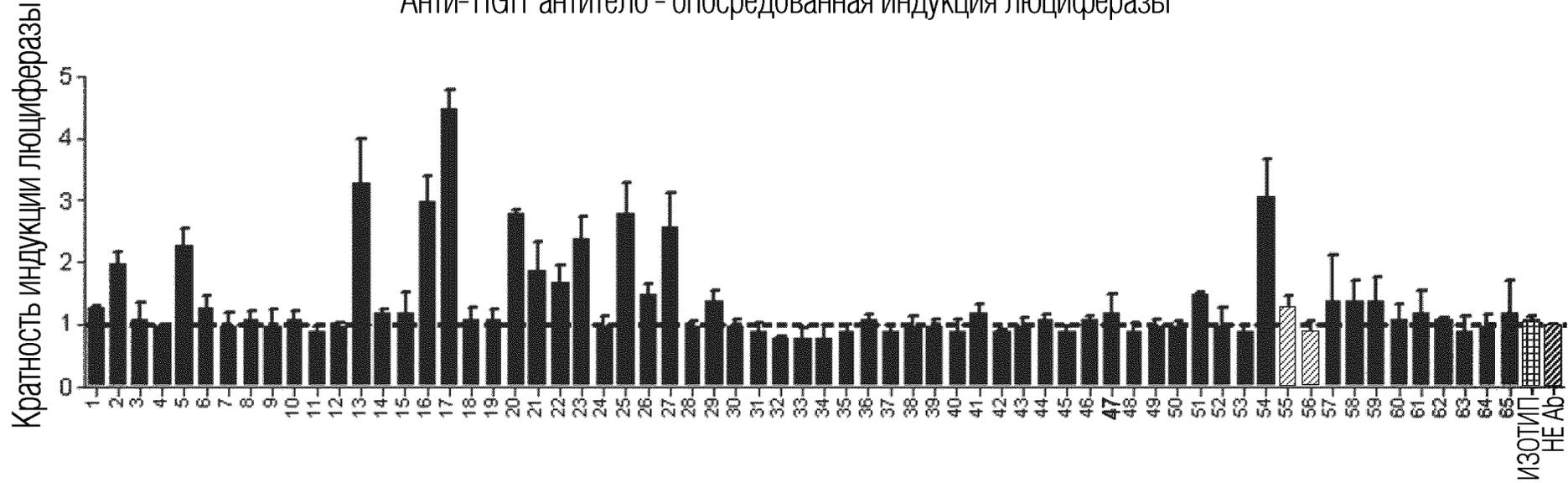


ФИГ. 6



# ФИГ. 7А

Анти-TIGIT антитело - опосредованная индукция люциферазы

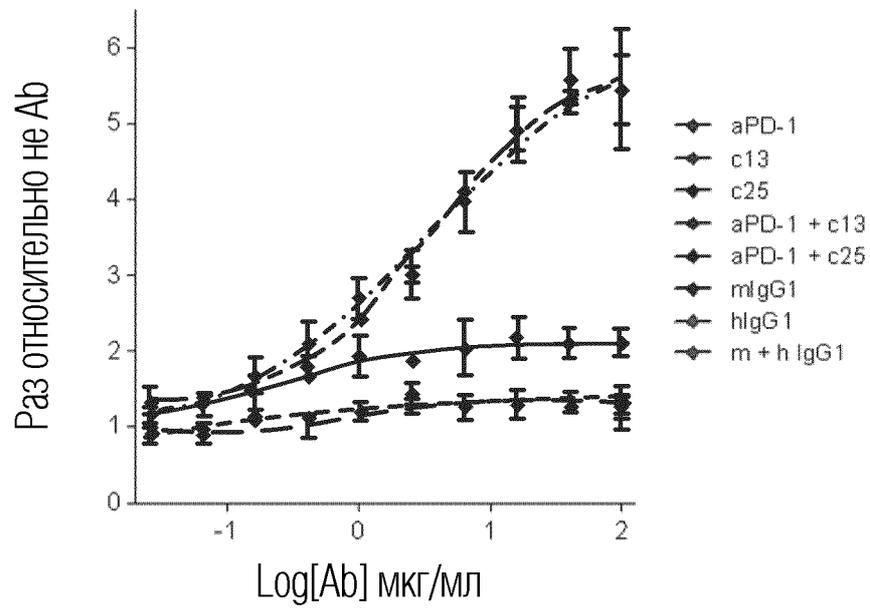


Корреляционный график TIGIT/CD155 Блокирования Биоанализ vs TIGIT-Fc

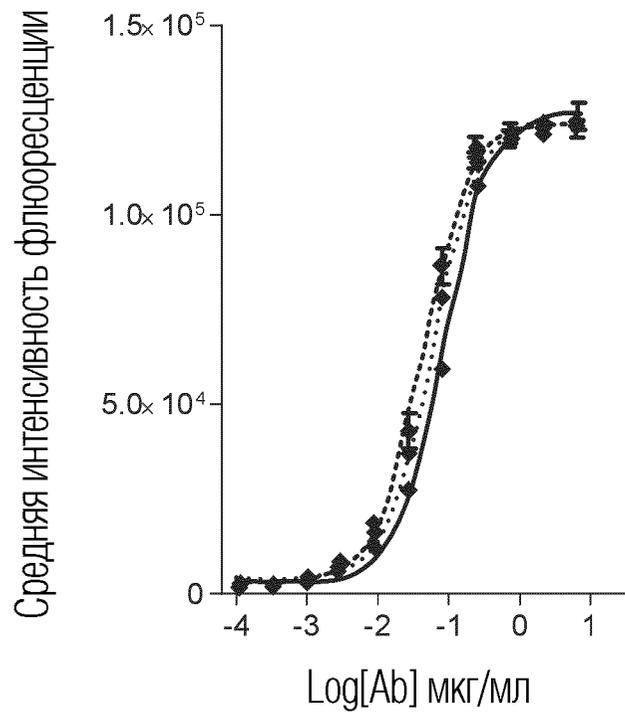




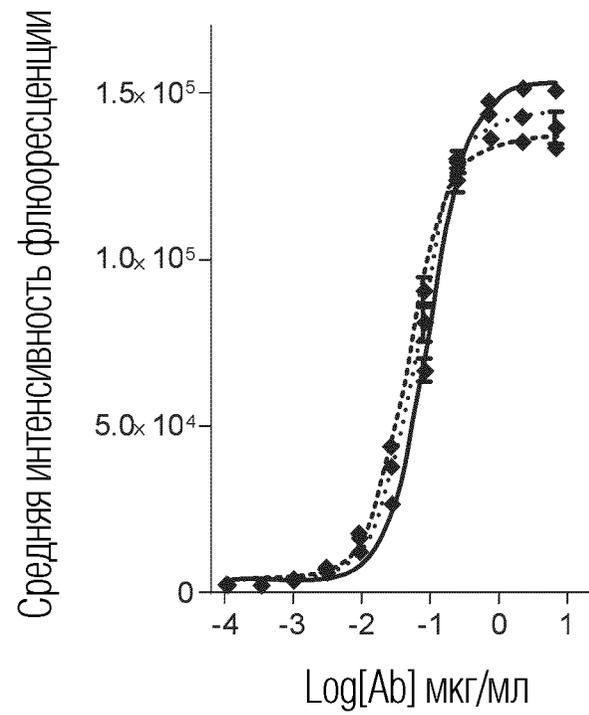
ФИГ. 8



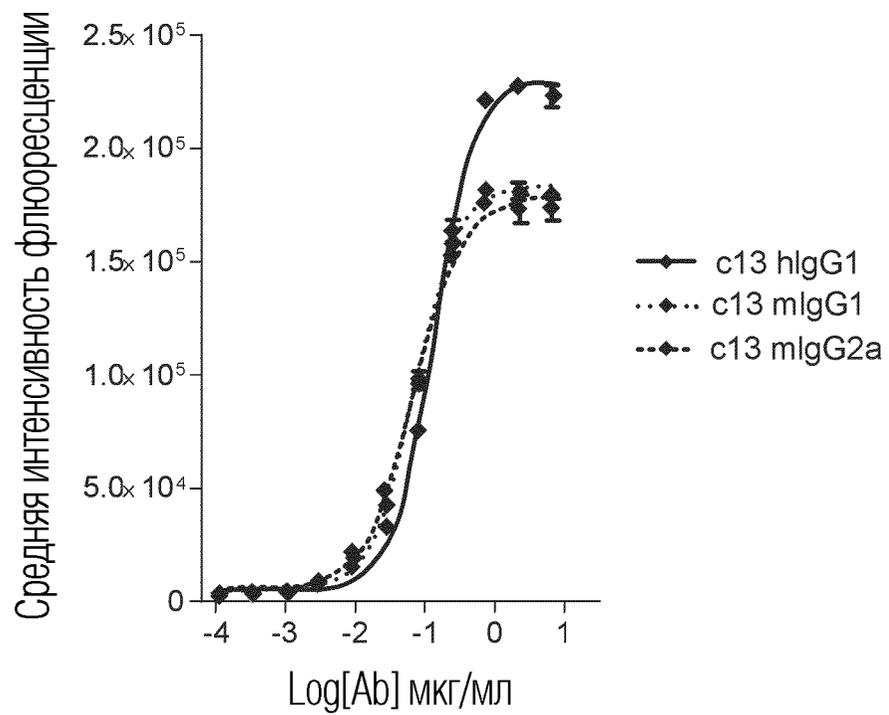
ФИГ. 9А



ФИГ. 9В



ФИГ. 9С

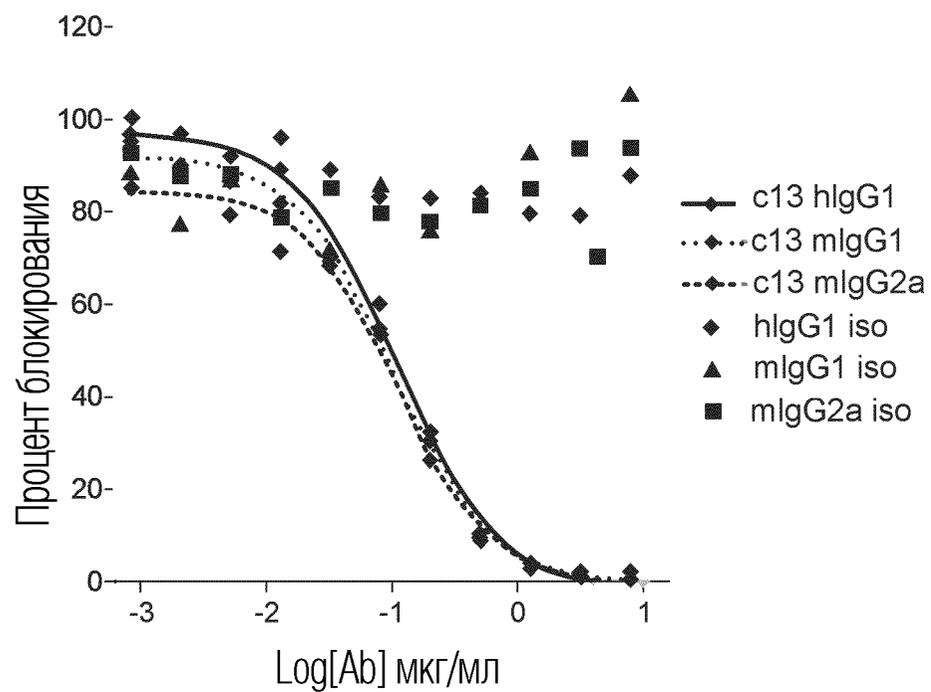


ФИГ. 9D

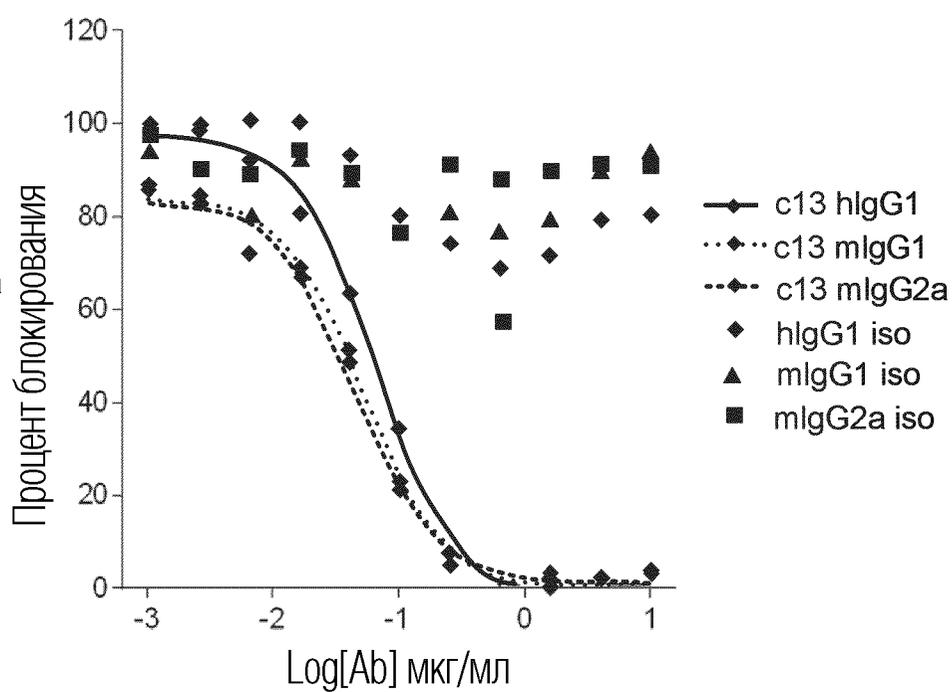
EC50s (мкг/мл)

	c13 hlgG1	c13 mlgG1	c13 mlgG2a
ЧЕЛОВЕК	0.09	0.05	0.04
МЫШЬ	0.10	0.06	0.05
супо	0.13	0.07	0.07

ФИГ. 9Е

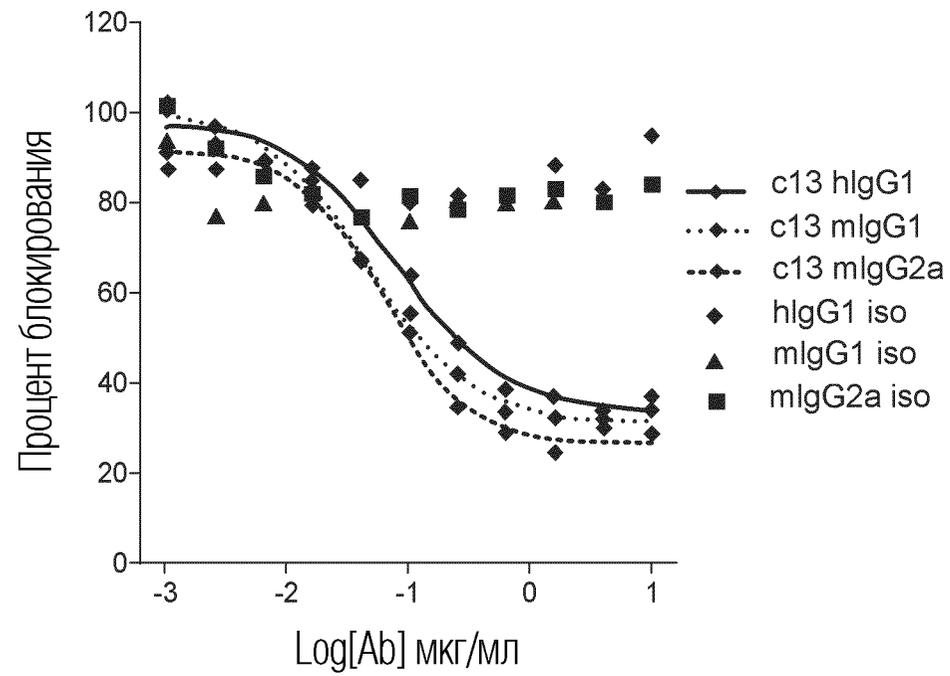


ФИГ. 9F

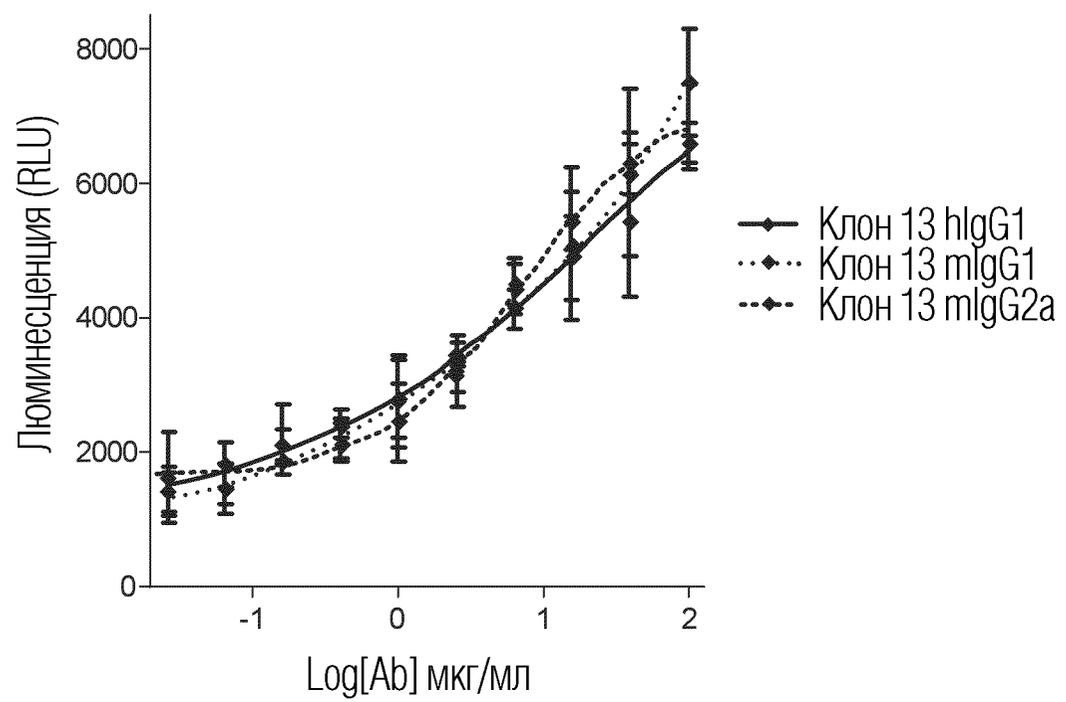


13/25

ФИГ. 9G

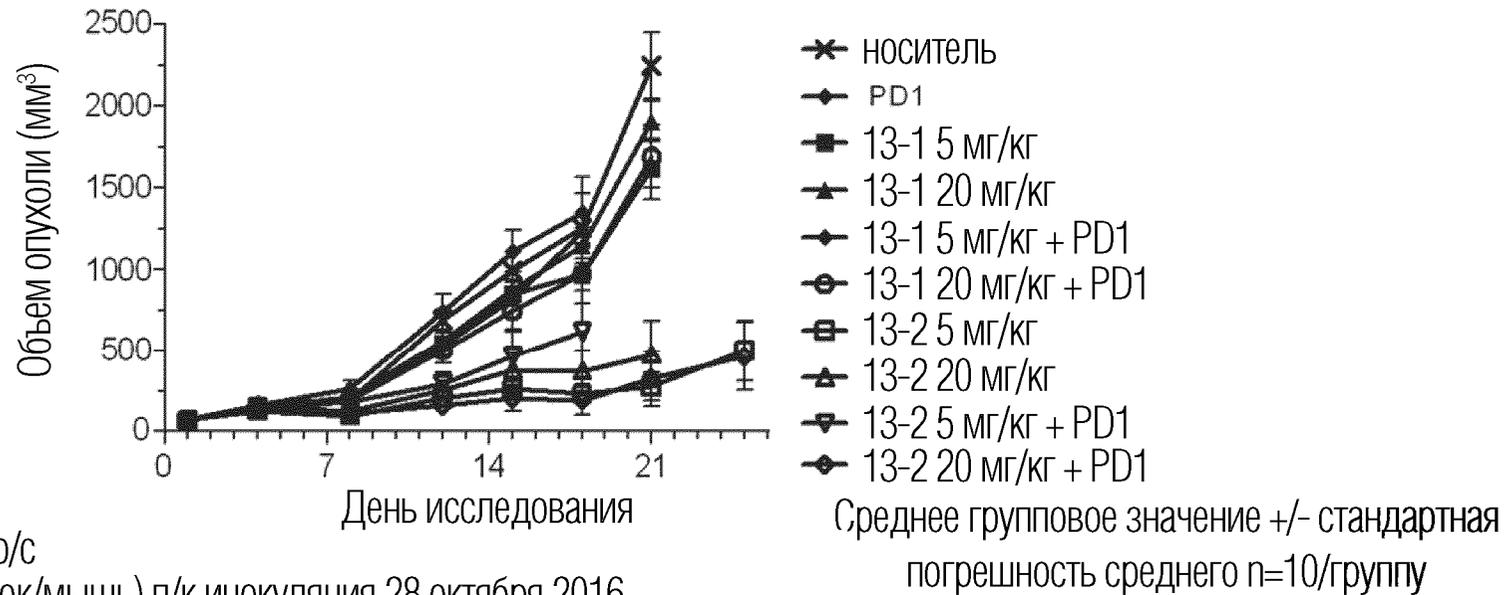


ФИГ. 9H



## ФИГ. 10А

aTIGIT + aPD-1 эффективность при лечении опухоли в модели сингенной опухоли  
CT26 Среднее групповое значение объема опухоли



Самки мыши Balb/c

CT26 (3E+05 клеток/мышь) п/к инокуляция 28 октября 2016

aTIGIT: два раза в неделю, 3 внутр. брюш. дозирования начиная с 1 дня

13-1 = mIgG1 химера клона 13

13-2 = mIgG2a химера клона 13

aPD-1: два раза в неделю, 2 внутр. брюш. дозирования начиная с 1 дня

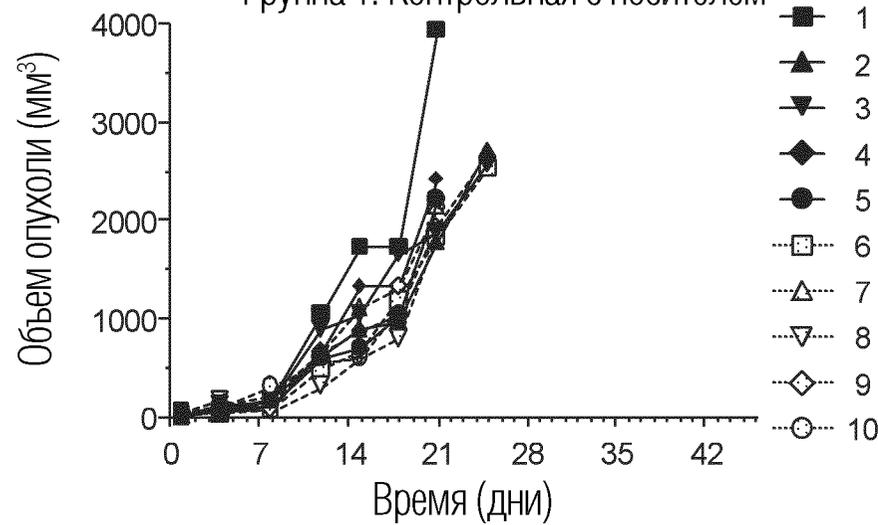
1 день исследования = 7 день после инокуляции опухоли

Charles River Laboratories Study # CT26-e323

# ФИГ. 10В

aTIGIT + aPD-1 эффективность при лечении опухоли в модели сингенной опухоли СТ26

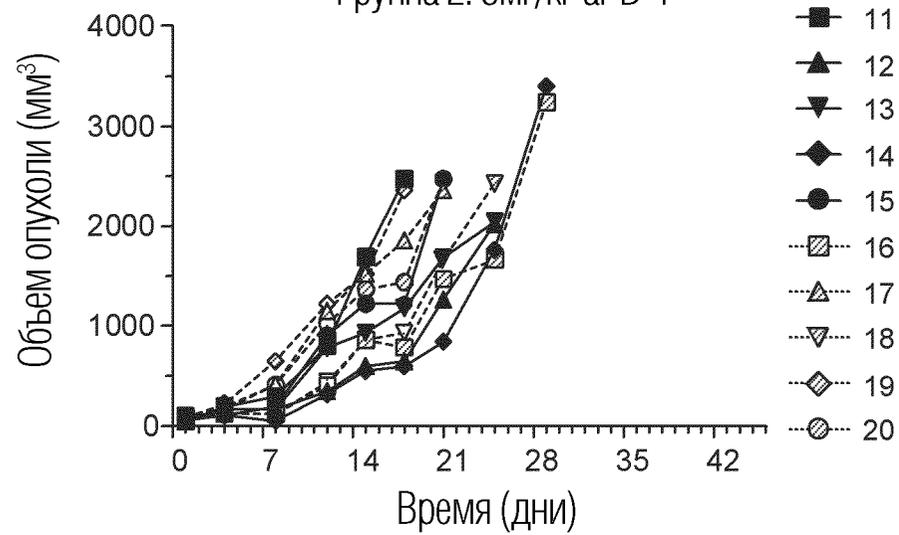
Индивидуальные объемы опухоли  
Группа 1: Контрольная с носителем



# ФИГ. 10С

aTIGIT + aPD-1 эффективность при лечении опухоли в модели сингенной опухоли СТ26

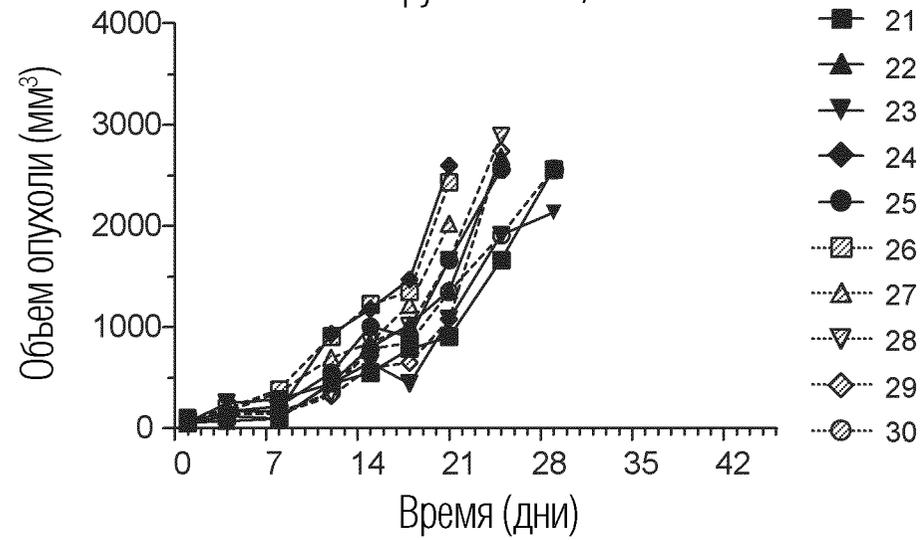
Индивидуальные объемы опухоли  
Группа 2: 5мг/кг aPD-1



## ФИГ. 10D

aTIGIT + aPD-1 эффективность при лечении опухоли в модели  
сингенной опухоли СТ26

Индивидуальные объемы опухоли  
Группа 3: 5мг/кг 13-1

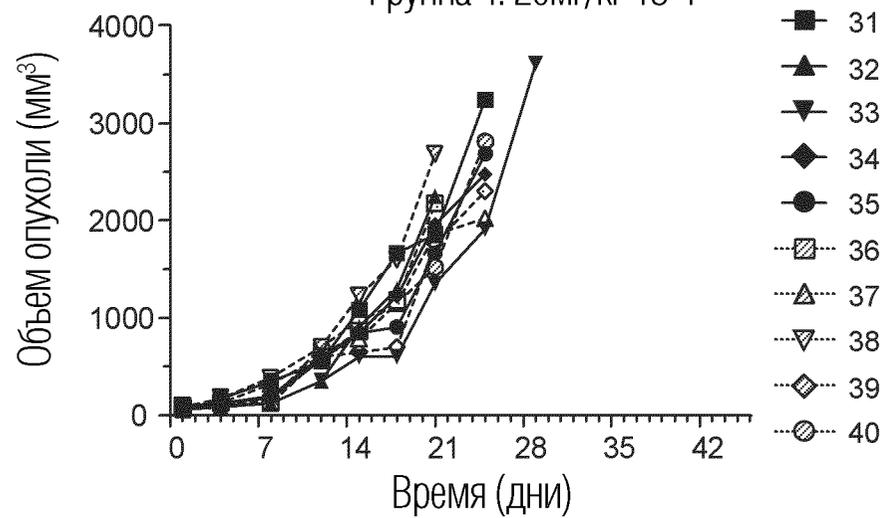


# ФИГ. 10Е

aTIGIT + aPD-1 эффективность при лечении опухоли в модели сингенной опухоли СТ26

Индивидуальные объемы опухоли

Группа 4: 20мг/кг 13-1

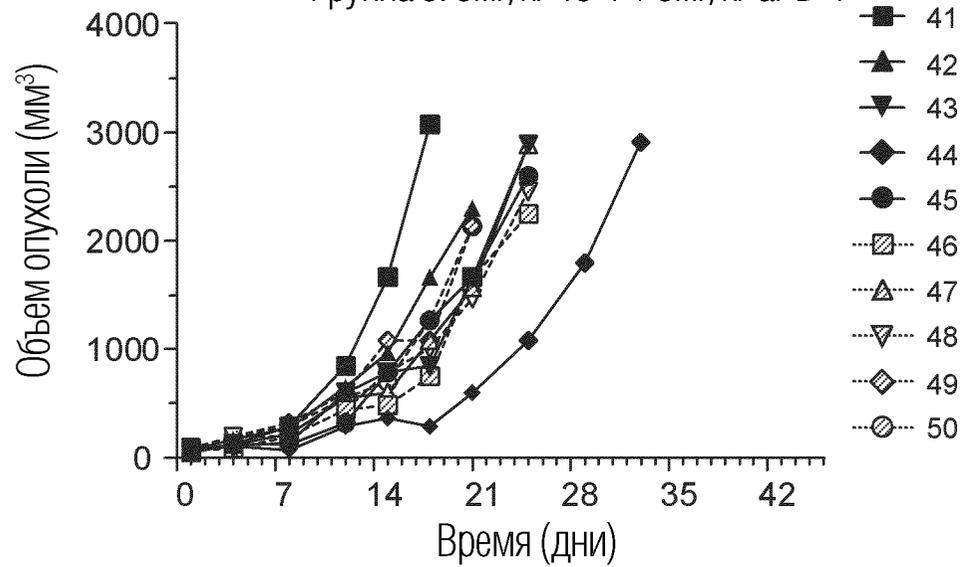


# ФИГ. 10F

aTIGIT + aPD-1 эффективность при лечении опухоли в модели сингенной опухоли СТ26

Индивидуальные объемы опухоли

Группа 5: 5мг/кг 13-1 + 5мг/кг aPD-1

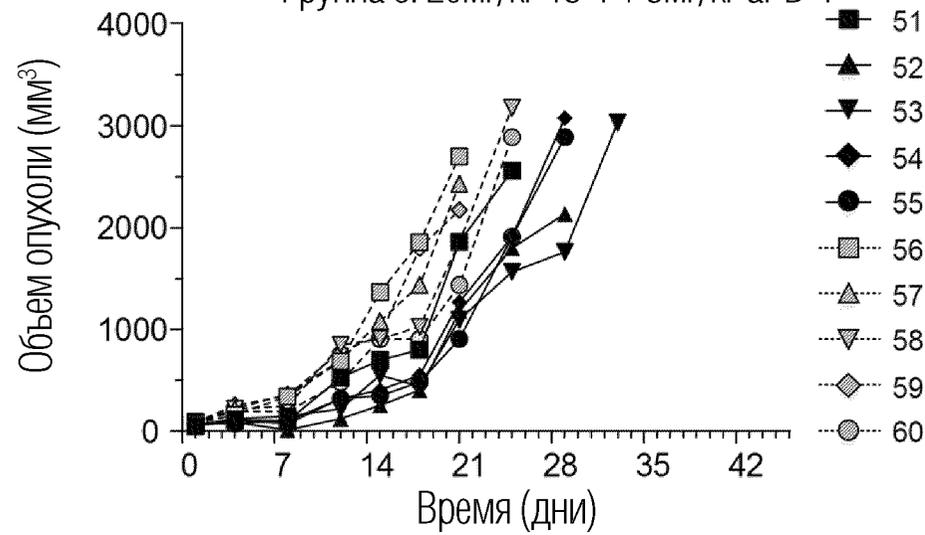


# ФИГ. 10G

aTIGIT + aPD-1 эффективность при лечении опухоли в модели сингенной опухоли СТ26

Индивидуальные объемы опухоли

Группа 6: 20мг/кг 13-1 + 5мг/кг aPD-1

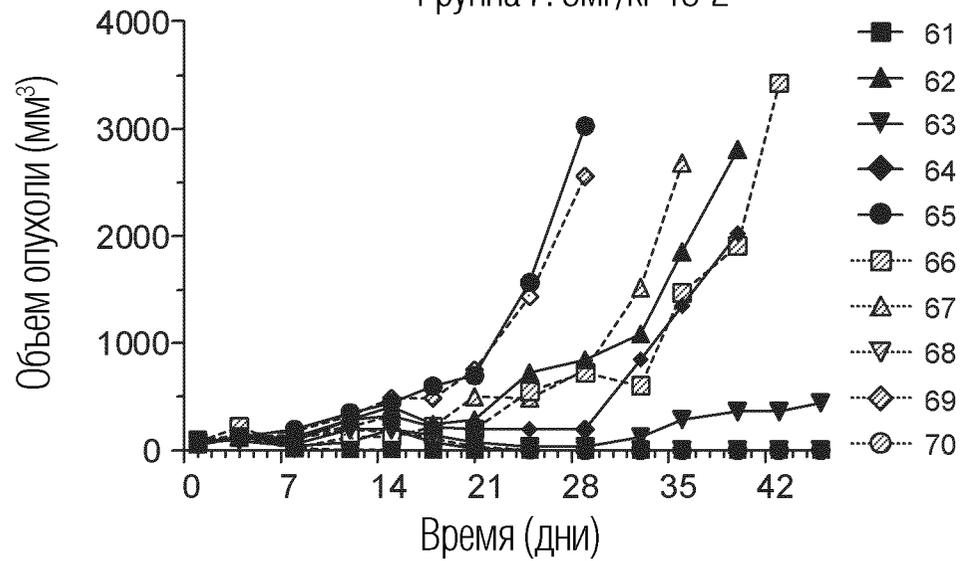


# ФИГ. 10Н

aTIGIT + aPD-1 эффективность при лечении опухоли в модели сингенной опухоли СТ26

Индивидуальные объемы опухоли

Группа 7: 5мг/кг 13-2

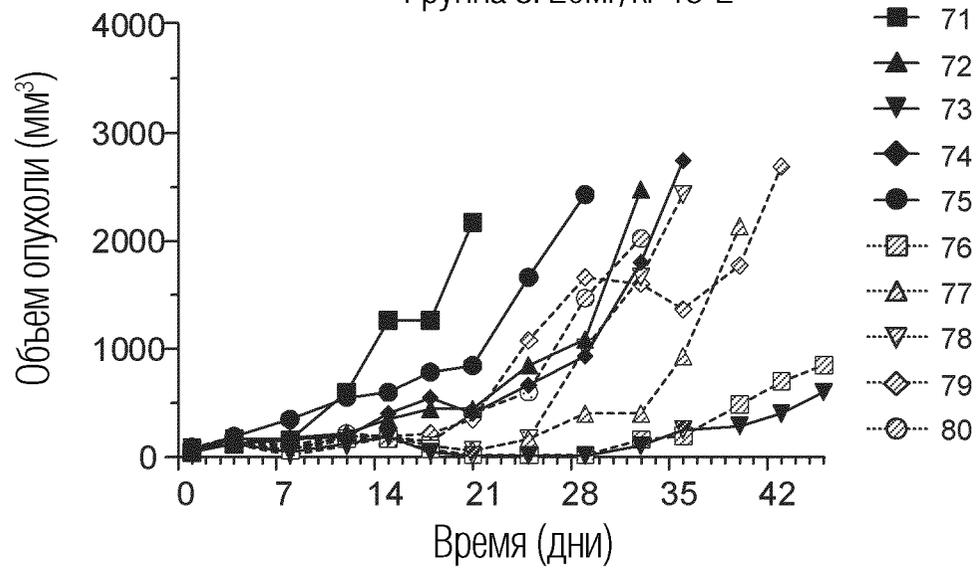


# ФИГ. 10I

aTIGIT + aPD-1 эффективность при лечении опухоли в модели сингенной опухоли СТ26

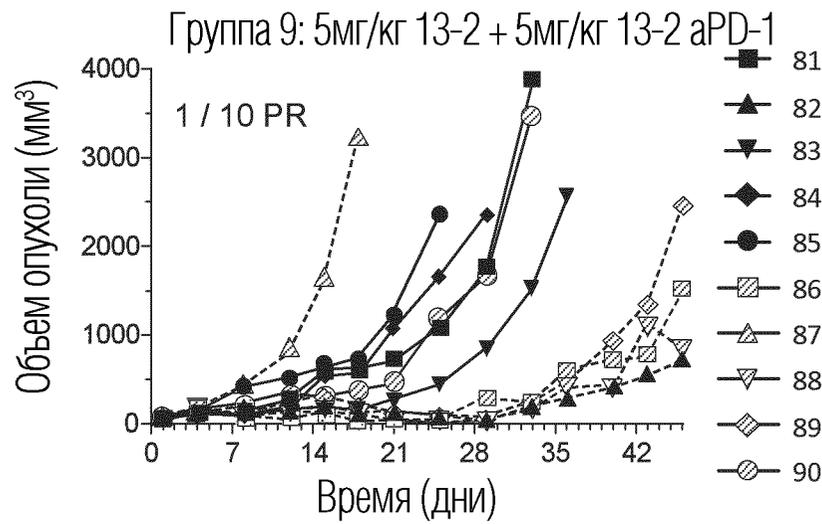
Индивидуальные объемы опухоли

Группа 8: 20мг/кг 13-2



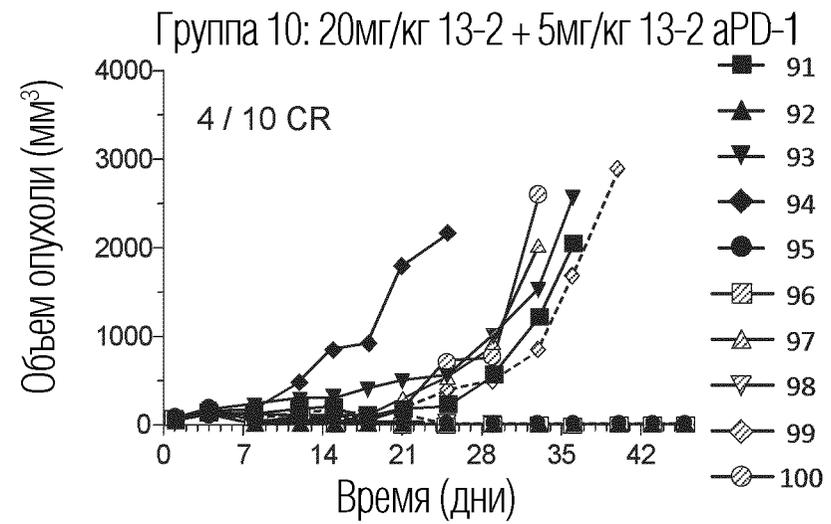
ФИГ. 10J

aTIGIT + aPD-1 эффективность при лечении опухоли в модели сингенной опухоли СТ26  
Индивидуальные объемы опухоли



ФИГ. 10K

aTIGIT + aPD-1 эффективность при лечении опухоли в модели сингенной опухоли СТ26  
Индивидуальные объемы опухоли



**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

**202390805****А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:***C07K 16/28 (2006.01)**C07K 16/46 (2006.01)**C07K 19/00 (2006.01)**A61K 39/395 (2006.01)**A61P 35/00 (2006.01)*

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

**Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:**

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)

C07K 16/28, 16/46, 19/00, A61K 39/395, A61P 35/00

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если возможно, используемые поисковые термины)  
Espacenet, EAPATIS, EPOQUE Net, Reaxys, Google**В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ**

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
X	WO 2006/125207 A2 (AMGEN INC et al.) 23.11.2006, формула, SEQ ID NO:41	1, 2, 5
X	WO 2017/021349 A1 (AMGEN RESEARCH (MUNICH) GMBH) 09.02.2017, формула, SEQ ID NO:35	1-5
X	US 8097704 B2 (AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 17.01.2012, формула, параграф [0046], SEQ ID NO:11	1, 2, 4, 5
X	EP 2330129 A2 (CENTOCOR ORTHO BIOTECH INC) 08.06.2011, формула, параграф [0034], SEQ ID NO:5	1-5
X	WO 2006/111353 A2 (MICROMET AG et al.) 26.10.2006, формула, пример 1.3, SEQ ID NO:17	1-5
X	WO 2006/099875 A1 (GENMAB A/S et al.) 28.09.2006, формула, SEQ ID NO:14	1-5
X	WO 2013/084147 A2 (NOVARTIS AG) 13.06.2013, формула, SEQ ID NO:24	1-5
X	WO 2007/084672 A2 (MEDAREX, INC et al.) 26.07.2007, формула, SEQ ID NO:19, страницы 3, 6	1-5
X	WO 2009/012401 A1 (IRM LLC et al.) 22.01.2009, SEQ ID NO:17, [0130], формула	1-3, 5
X	WO 2009/155015 A1 (IMCLONE LLC et al.) 23.12.2009, SEQ ID NO:8, формула, страницы 3, 6, 10	1-5
X	WO 2009/061996 A2 (CELLDEX THERAPEUTICS INC et al.) 14.05.2009, формула, SEQ ID NO:12	1-5

 последующие документы указаны в продолжении

\* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

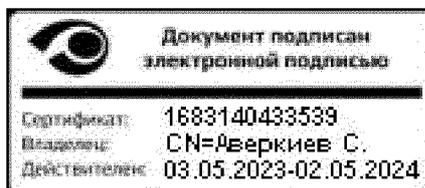
«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&amp;» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 22 августа 2023 (22.08.2023)

Уполномоченное лицо:  
Начальник Управления экспертизы

С.Е. Аверкиев

**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**  
**(дополнительный лист)**

Номер евразийской заявки:

**202390805**

**ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ (продолжение графы В)**

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
X	EP 2383295 A1 (MEDAREX, INC) 02.11.2011, формула, SEQ ID NO:66, формула	1-5
X	US 8637017 B2 (AFFITECH RESEARCH AS) 28.01.2014, формула, SEQ ID NO:67, формула	1-5
X	US 8080247 B2 (JANSSEN BIOTECH, INC) 20.12.2011, SEQ ID NO:4, формула, параграф [0029]	1-3, 5
X	EP 3042956 A1 (UNIVERSITY OF MIYAZAKI et al.) 13.07.2016, SEQ ID NO:10, формула	1, 2, 5
X	WO 2006/039418 A2 (MEDAREX INC et al.) 13.04.2006, SEQ ID NO:16, формула	1-5
X	EP 1691197 A2 (MILLER JONATHAN L) 16.08.2006, SEQ ID NO:55, формула	1, 2, 5
X	EP 2982694 A1 (ENGMAB AG) 10.02.2016, SEQ ID NO:32, формула, параграф [0184]	1-5
X	WO 2009073524 A2 (MEDAREX, INC et al.) 11.06.2009, формула, SEQ ID NO:7, страница 46	1-5
X	EP 2917360 A2 (MEDIMMUNE, LLC) 16.09.2015, SEQ ID NO:142, формула, параграфы [0031], [0034]	1-5
X	US 8802089 B2 (GENMAB A/S) 12.08.2014, SEQ ID NO:11, формула	1-5
X	WO 2010/115552 A1 (ROCHE GLYCART AG et al.) 14.10.2010, SEQ ID NO:54, формула	1-3, 5
X	US 8715669 B2 (MASTERNAK KRZYSZTOF et al) 06.05.2014, SEQ ID NO:67, формула, параграфы [0151], [0157]	1-5
X	WO 2016/081639 A1 (GENENTECH, INC et al.) 26.05.2016, SEQ ID NO:26, формула, параграф [0047]	1-5
X	WO 2009/089998 A1 (PHILOCHEM AG et al.) 23.07.2009, SEQ ID NO:4, страница 23, формула	1-5
X	WO 2016/070050 A1 (BIOGEN MA INC) 06.05.2016, SEQ ID NO:61, 71, 77, формула, страницы 3, 33	1-5
X	WO 2016/081640 A1 (GENENTECH, INC et al.) 26.05.2016, SEQ ID NO:157, 162, формула, параграф [0016]	1-5
X	JOHNSTON Robert J. et al. The Immunoreceptor TIGIT Regulates Antitumor and Antiviral CD8+ T Cell Effector Function. Cancer Cell, 2014, SUMMARY	1-5