

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390866** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.09.29

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.12.29

(54) **АНТИ-TIGIT АНТИТЕЛА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В КАЧЕСТВЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ И ДИАГНОСТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ**

(31) PCT/CN2017/120392

(32) 2017.12.30

(33) CN

(62) 202091587; 2018.12.29

(71) Заявитель:
БЕЙДЖИН, ЛТД. (GB)

(72) Изобретатель:

**Чжан Тун, Сюэ Лю, Лю Ци, Вэй Минь,
Ли Кан (CN)**

(74) Представитель:

**Харин А.В., Стойко Г.В., Галухина
Д.В., Буре Н.Н., Алексеев В.В. (RU)**

(57) Настоящее изобретение относится к антителам, которые специфически связываются с TIGIT (Т-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и ITIM, WUCAM или Vstm3) и ингибируют Tigit-опосредованную клеточную передачу сигналов и активности в иммунных клетках. Настоящее изобретение также включает применение этих антител для лечения или диагностики рака, инфекционных заболеваний или других патологических расстройств, которые могут модулироваться Tigit-опосредованными функциями.

202390866

A1

A1

202390866

АНТИ-TIGIT АНТИТЕЛА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В КАЧЕСТВЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ И ДИАГНОСТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ

РОДСТВЕННАЯ ЗАЯВКА

[0001] Данная заявка испрашивает приоритет на основании заявки на патент № PCT/CN2017/120392, поданной 30 декабря 2017 г. Полное содержание вышеупомянутой заявки включено в данное описание посредством ссылки для всех целей.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0002] Настоящая заявка относится к антителам, которые специфически связываются с TIGIT (Т-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и ITIM), и их применению.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Tigit (Т-клеточный иммуноглобулин и домен ITIM) является трансмембранным белком типа I, членом семейства белков CD28, который играет важную роль в ингибировании опосредованных Т-клетками и NK-клетками функциональных активностей в противоопухолевом иммунитете [Boles KS, et al., 2009 Eur J Immunol, 39: 695-703; Stanietsky N, et al., 2009 PNAS 106: 17858-63; Yu X, et al. 2009 Nat. Immunol, 10: 48-57].

[0004] Гены и кДНК, кодирующие TIGIT, были клонированы и охарактеризованы у мышей и людей. Полноразмерный TIGIT человека имеет последовательность длиной 244 аминокислоты (SEQ ID NO: 1), в которой первые 21 аминокислота составляют сигнальный пептид. Аминокислотная последовательность зрелого TIGIT человека содержит 223 аминокислотных (aa) остатка (учетный номер NCBI: NM_173799). Внеклеточный домен (ECD) зрелого TIGIT человека состоит из 120 аминокислотных остатков (SEQ ID NO: 2, соответствующих аминокислотам 22-141 SEQ ID NO: 1) с Ig-подобным доменом V-типа (соответствует аминокислотам 39-127 SEQ ID NO: 1), за которыми следуют трансмембранная последовательность из 21 аминокислоты (aa) и цитоплазматический домен из 82 аминокислот (aa) с иммунорецепторным ингибиторным мотивом на основе тирозина (ITIM) [Yu X, et al. 2009 Nat. Immunol, 10: 48-57; Stengel KF, et al. 2012 PNAS 109:

5399-04]. В пределах ECD TIGIT человека имеет только 59 % и 87 % идентичности аминокислотных (aa) последовательностей с мышами и яванскими макаками, соответственно.

[0005] TIGIT экспрессируется на Т-клетках (включая активированные Т-клетки, Т-клетки памяти, регуляторные Т-клетки (Treg) и фолликулярные Т-хелперные клетки (Tfh)) и NK-клетках [Boles KS, et al., 2009 Eur J Immunol, 39: 695-703; Joller N, et al., 2014 Immunity 40: 569-81; Levin SD, et al., 2011 Eur J Immunol, 41: 902-15; Stanietsky N, et al., 2009 PNAS 106: 17858-63; Yu X, et al. 2009 Nat. Immunol, 10: 48-57].

[0006] До настоящего времени были идентифицированы два лиганда Tigit: CD155 (также известный как рецептор полиовируса или PVR) и CD112 (также известный как связанный с рецептором полиовируса 2, PVRL2, нектин-2). Эти лиганды в основном экспрессируются на APC (антигенпрезентирующих клетках, таких как дендритные клетки и макрофаги) и опухолевых клетках [Casado JG, et al., 2009 Cancer Immunol Immunother 58: 1517-26; Levin SD, et al., 2011 Eur J Immunol, 41: 902-15; Mendelsohn CL et al., 1989, 56: 855-65; Stanietsky N, et al., 2009 PNAS 106: 17858-63; Yu X, et al. 2009 Nat. Immunol, 10: 48-57]. Как молекула иммунной «контрольной точки», Tigit инициирует ингибирующую передачу сигналов в иммунных клетках при взаимодействии со своими лигандами, CD155 и CD112. Аффинность связывания Tigit с CD155 (Kd: около 1 нМ) намного выше, чем с CD112, и является ли взаимодействие TIGIT и CD112 функционально значимым в опосредовании ингибирующих сигналов еще предстоит определить. Костимулирующий рецептор CD226 (DNAM-1) связывается с теми же лигандами с более низкой аффинностью (Kd: около 100 нМ), но дает положительный сигнал [Bottino C, et al., 2003 J Exp Med 198: 557- 67]. Кроме того, CD96 (Tactile), «Tigit-подобный» рецептор, также играет аналогично ингибирующую роль в том же пути [Chan CJ, et al., 2014 Nat. Immunol 15:431-8].

[0007] Tigit может ингибировать иммунные ответы через различные механизмы. Во-первых, взаимодействие между TIGIT и PVR на дендритных клетках (DC) может давать «обратную сигнализацию» в DC, приводя к положительной регуляции IL-10 и снижению секреции IL-12, тем самым ингибируя активацию Т-клеток [Yu X, et al. Nat Immunol.2009 10: 48–57]. Во-вторых, TIGIT связывается с CD155 с более высокой аффинностью, тем самым конкурируя со взаимодействием DNAM-1-CD155. В-третьих,

прямое лигирование TIGIT на Т-клетках может отрицательно регулировать TCR-опосредованную активацию, и последующая пролиферация и привлечение TIGIT на NK-клетки блокируют цитотоксичность NK-клеток [Joller N, et al. 2011, 186: 1338-42; Stanietsky N, et al., 2009 PNAS 106: 17858-63]. В-четвертых, экспрессия Tigit на Tregs ассоциирована с высокоактивированным и супрессивным фенотипом в опухолевой ткани, и передача сигналов TIGIT в Tregs может способствовать стабильности Treg [Joller N, et al. Immunity 2014 40:569-81; Kurtulus S, et al. J Clin Invest. 2015 125: 4053–4062].

[0008] TIGIT имеет мотив, подобный тирозиновому хвосту иммуноглобулина (ИТТ), за которым следует иммунорецепторный мотив ингибирования на основе тирозина (ИТИМ) в его цитоплазматическом хвосте [Yu X, et al. Nat Immunol. 2009 10:48–57; Engels N, et al. Curr Opin Immunol 2011 23: 324–329]. Эти мотивы могут опосредовать рекрутирование фосфатазы SHIP-1 и β -аррестина 2 [Li M, et al. J Biol Chem. 2014 289:17647–17657; Liu S, et al. Cell death and differentiation 2013 20: 456-464], обеспечивая таким образом механизм, с помощью которого TIGIT может сам по себе давать ингибирующие сигналы для ослабления активирующих сигналов.

[0009] Положительная регуляция экспрессии Tigit в опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах (TIL) и мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC) была зарегистрирована при многих типах рака, таких как рак легкого [Tassi, et al., Cancer Res. 2017 77: 851-861], рак пищевода [Xie J, et al., Oncotarget 2016 7: 63669-63678], рак молочной железы [Gil Del Alcazar CR, et al. Pак Discov. 2017], острый миелоцитарный лейкоз (AML) [Kong Y et al., Clin Cancer Res. 2016 22: 3057-66] и меланома [Chauvin JM, et al., J Clin Invest. 2015 125: 2046-2058]. Повышенная экспрессия Tigit в AML ассоциирована с плохим прогнозом выживаемости пациентов [Kong Y et al., Clin Cancer Res. 2016 22: 3057-66]. Положительная регуляция передачи сигналов Tigit играет важную роль не только в иммунной толерантности к раку, но также хронической вирусной инфекции. Во время ВИЧ-инфекции экспрессия Tigit на Т-клетках была значительно более высокой и положительно коррелировала с вирусной нагрузкой и прогрессированием заболевания [Chew GM, et al., 2016 PLoS Pathog. 12: e1005349]. Кроме того, блокада рецептора Tigit в отдельности или в сочетании с другой блокадой может восстановить функционально «истощенные» Т-клетки как *in vitro*, так и *in vivo* [Chauvin JM, et al., J Clin Invest. 2015 125:2046-2058; Chew GM, et al., 2016 PLoS Pathog. 12:e1005349; Johnston RJ, et al. Cancer

Cell 2014 26: 923-937]. В случаях рака и вирусных инфекций активация передачи сигналов Tigit способствует дисфункции иммунных клеток, что приводит к разрастанию рака или распространению вирусной инфекции. Ингибирование Tigit-опосредованной ингибирующей передачи сигналов с помощью терапевтических агентов может восстанавливать функциональную активность иммунных клеток, включая Т-клетки, НК-клетки и дендритные клетки (DC), следовательно, повышая иммунитет против рака или хронической вирусной инфекции.

[0010] Следовательно, модуляция передачи сигналов Tigit с помощью антагонистических молекул может избавить иммунные клетки от толерантности, вызывая эффективные иммунные ответы для уничтожения опухолей или хронических вирусных инфекций.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0011] Настоящее изобретение по меньшей мере частично основано на обнаружении набора моноклональных антител (mAb), которые ингибируют Tigit-опосредованную клеточную передачу сигналов в иммунных клетках, повторно активируют иммунные клетки и повышают иммунитет путем специфического связывания с Tigit. Соответственно, в первом аспекте настоящая заявка относится к анти-Tigit антителу и его антигенсвязывающему фрагменту, которое способно связываться с Tigit человека (SEQ ID NO: 1). Настоящее изобретение также относится к гуманизированной версии анти-Tigit mAb по первому аспекту.

[0012] В конкретных вариантах осуществления антитело согласно настоящей заявке содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую одну, две или три CDR (область, определяющая комплементарность), имеющие аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 3, 4, 5 или 13, или их варианты, содержащие одну или более консервативных замен, например, одну или две консервативные замены в аминокислотных последовательностях SEQ ID NO 3, 4, 5 или 13; и/или переменную область легкой цепи (VL), содержащая одну, две или три CDR, имеющие аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 6, 7 или 8, или их варианты, содержащие одну или более консервативных замен, например одну или две консервативные замены в аминокислотных последовательностях SEQ ID NO: 6, 7 или 8.

[0013] В более конкретном варианте осуществления антитело согласно настоящей заявке содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую VH-CDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 или ее вариант, содержащий одну или более консервативных замен, например одну или две консервативные замены, VH-CDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 13 или их вариант, содержащий одну или более консервативных замен, например одну или две консервативные замены, и VH-CDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или ее вариант, содержащий одну или более консервативных замен, например одну или две консервативные замены; и/или переменную область легкой цепи (VL), содержащую VL-CDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или ее вариант, содержащий одну или более консервативных замен, например одну или две консервативные замены, VL-CDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или ее вариант, содержащий одну или более консервативных замен, например, одну или две консервативные замены, и VL-CDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 или ее вариант, содержащий одну или более консервативных замен, например одну или две консервативные замены.

[0014] Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящей заявке способно связываться с Tigit человека и содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 9, 14, 19, или последовательность, имеющую по меньшей мере 85 %, по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 96 %, по меньшей мере 97 %, по меньшей мере 98 %, по меньшей мере 99 % идентичность последовательности с SEQ ID NO: 9, 14, 19. В одном варианте осуществления различие в последовательности находится в каркасной области. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, кодируемую нуклеотидной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 10, 15 или 20, или ее вариантом.

[0015] Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящей заявке способно связываться с Tigit человека и содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 11, 16, 21 или 24, или последовательность, имеющую по меньшей мере 85 %, по меньшей мере

90 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 96 %, по меньшей мере 97 %, по меньшей мере 98 %, по меньшей мере 99 % идентичность последовательности с SEQ ID NO: 11, 16, 21 или 24. В одном варианте осуществления различие в последовательности находится в каркасной области. В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, кодируемую нуклеотидной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 12, 17 или 22, или ее вариантом.

[0016] В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способно связываться с Tigit человека со значением K_d от около 1×10^{-9} М до около 1×10^{-12} М. Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способно связываться с Tigit человека со значением K_d меньше около 1×10^{-9} М, меньше около 1×10^{-10} М, меньше около 1×10^{-11} М или меньше около 1×10^{-12} М.

[0017] В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит константную область тяжелой цепи подкласса IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 или их варианта и константную область легкой цепи типа каппа или лямбда или их варианта. В более конкретном варианте осуществления область Fc антитела представляет собой Fc человеческого IgG1 или его вариант, например область Fc с SEQ ID NO: 18.

[0018] В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способствует образованию IFN- γ антиген-специфическими Т-клетками. В более конкретном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способствует образованию IFN- γ антиген-специфическими Т-клетками дозозависимым образом.

[0019] В более конкретном варианте осуществления антитело согласно настоящей заявке снижает поверхностную экспрессию Tigit рецептора через Fc γ R-опосредованный трофоцитоз, в частности, Fc γ RIIB-опосредованный трофоцитоз.

[0020] В одном варианте осуществления антитело согласно настоящей заявке демонстрирует рН-зависимое связывание с антигеном, такое что антитело проявляет более сильное связывание с TIGIT человека при слабом кислотном рН в микроокружении опухоли (например, рН 6,0) по сравнению со связыванием с TIGIT человека при физиологическом показателе рН (например, рН 7,4). В более конкретном варианте осуществления антитело согласно настоящей заявке имеет (1) соотношение K_D при рН

7,4/pH 6,0 более 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или более, и/или (2) значение R_{max} (RU) при pH 6,0, которое составляет по меньшей мере в 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз выше R_{max} при pH 7,4, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (Biacore) или аналогичного метода.

[0021] Анти-Tigit mAb, раскрытые в настоящем документе, имеют потенциальное терапевтическое применение для лечения рака, борьбы с вирусными инфекциями и другими заболеваниями человека, которые механически связаны с иммунной толерантностью или «истощением». Соответственно, в дополнительных вариантах осуществления анти-Tigit антитело согласно настоящей заявке предназначено для применения для лечения рака. В другом конкретном варианте осуществления анти-Tigit антитело согласно настоящей заявке предназначено для применения для лечения инфекции, лечения инфекционного заболевания и/или борьбы с вирусными инфекциями. В другом конкретном варианте осуществления анти-Tigit антитело согласно настоящей заявке предназначено для применения для лечения других заболеваний человека, связанных с или вызванных иммунной толерантностью, или для лечения заболевания, которое можно корректировать путем увеличения активации иммунных клеток.

[0022] В дополнительном аспекте настоящая заявка относится к композиции, содержащей анти-Tigit антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и терапевтически приемлемый эксципиент.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0023] Фиг. 1 Схематическая диаграмма Tigit-mIgG2a (верхняя) и Tigit-huIgG1 (нижняя). Tigit ECD: внеклеточный домен tigit. N: N-конец. C: C-конец.

[0024] Фиг. 2 Филогенетические деревья областей Vh (A) и Vk (B) анти-Tigit антитела. Последовательности Vh и Vk варианта анти-Tigit антитела сопоставляли с использованием программного обеспечения DNASTAR Megalign. Гомология последовательности показана в филогенетических деревьях.

[0025] Фиг. 3 Определение аффинности очищенных мышинных анти-Tigit антител с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

[0026] Фиг. 4 Определение связывания Tigit с помощью проточной цитометрии.

[0027] Фиг. 5(A) Схематическая диаграмма, показывающая ингибирование взаимодействий Tigit-лиганд с помощью анти-Tigit mAb. (B) Связывание растворимого Tigit (слитого белка Tigit-huIgG1) с экспрессирующими лиганд Tigit клетками HEK293 (HEK293/PVR или HEK293/PVR-L2) определяли с помощью проточной цитометрии. Блокаду взаимодействия Tigit-лиганд количественно измеряли путем добавления последовательно разбавленных анти-Tigit антител. Результаты показаны с помощью среднего \pm SD для двух повторных измерений.

[0028] Фиг. 6 Активация ЦМВ (цитомегаловирус)-специфичных человеческих Т-клеток с помощью анти-Tigit mAbs. Пептид человеческого ЦМВ (NLVPMVATV, 495-503), сенсibilизированный HLA-A2.1⁺ РВМС (4×10^4), стимулировали клетками-мишенями, активированными пептидом ЦМВ, клетками НСТ116 (10^4) в течение ночи в присутствии анти-Tigit антител. IFN- γ в культуральном супернатанте определяли с помощью иммуноферментного анализа (ИФА, ELISA). Все условия осуществляли в трех повторных измерениях. Результаты показаны как среднее \pm SD.

[0029] Фиг. 7 Анти-Tigit mAb способствуют цитотоксичности, опосредованной НК-клетками. (A) Экспрессия Tigit и DNAM-1 на сконструированной стабильной клеточной линии NK92MI/Tigit-DNAM-1. (B) Уничтожение клеток NK92MI/Tigit-DNAM-1 относительно клеток SK-MES-1/PVR в присутствии hu1217-2-2/IgG1mf (0,007-30 мкг/мл) определяли с помощью анализа высвобождения LDH (лактатдегидрогеназы), как описано в Примере 8. Результаты показаны как среднее \pm SD для трех повторных измерений.

[0030] Фиг. 8 Анти-Tigit mAb hu1217-2-2/IgG1wt снижает поверхностную экспрессию рецептора Tigit через Fc γ R-опосредованный трогоцитоз. Клетки Jurkat/Tigit инкубировали с Fc γ R-экспрессирующими клетками HEK293 в присутствии анти-Tigit mAb, меченных биотином, в полной среде в течение ночи. В некоторых случаях добавляли 10% человеческую сыворотку АВ (human АВ), чтобы определить влияние большого количества человеческого IgG на трогоцитоз. Поверхностную экспрессию рецептора Tigit определяли окрашиванием с помощью SA-APC (Biolegend). MFI (средняя интенсивность флуоресценции) определяли методом проточной цитометрии. Все точки данных представлены для двух повторных измерений. Результаты показаны как среднее \pm SD.

[0031] Фиг. 9 ADCC-эффекты (ADCC - антителозависимая клеточная цитотоксичность) анти-Tigit mAb на мононуклеарные клетки периферической крови

человека (PBMC). (A) Экспрессию Tigit на PNA-стимулированных PBMC от здоровых доноров определяли с помощью проточной цитометрии. CD4⁺ (CD4⁺Foxp3⁻), CD8⁺ Т-эффекторы и регуляторные Т-клетки (Tregs, CD4⁺ Foxp3⁺) все экспрессировали значительные уровни Tigit (18 ~ 41 %). Показанные данные являются показательными результатами от 3 здоровых доноров. (B) Анализ ADCC проводили с использованием CD16⁺ человеческой линии NK-клеток NK92MI/CD16V в качестве эффекторных клеток и PNA-стимулированных PBMC в качестве клеток-мишеней в присутствии mAb к Tigit (30 мкг/мл) или контрольных антител (ОКТ3 при 5 мкг/мл в качестве положительного контроля и huIgG при 30 мкг/мл в качестве отрицательного контроля) в течение 42 часов. Процент CD3⁺, CD8⁺ Т-клеток и Tregs определяли с помощью проточной цитометрии.

[0032] Фиг. 10 CDC-эффекты (CDC – комплемент-зависимая цитотоксичность) анти-Tigit mAb на PBMC человека. Анализ CDC проводили с использованием PNA-стимулированных PBMC в качестве клеток-мишеней и аутологичных сывороток в качестве источника комплементов. Через 3 дня совместного культивирования предварительно активированных PBMC с анти-Tigit mAb (0,01-100 мкг/мл) в конечной концентрации 15% аутологичных сывороток процент CDC (ось Y) измеряли с помощью анализа свечения титра клеток и рассчитывали, как описано в Примере 11. Показаны данные от доноров А и В. HuIgG использовали в качестве отрицательного контроля, тогда как анти-МНС-А, В, С использовали в качестве положительного контроля.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определения

[0033] Консервативные аминокислотные замены аминокислот общеизвестны в данной области техники и приведены в качестве примера в таблице ниже. В общем смысле, консервативная аминокислотная замена означает, что аминокислотный остаток заменен другим аминокислотным остатком, имеющим схожую боковую цепь.

Исходный аминокислотный остаток	Однобуквенные и трехбуквенные коды	Консервативная(-ые) замена(-ы)
Аланин	А или Ala	Gly; Ser

Аргинин	R или Arg	Lys; His
Аспарагин	N или Asn	Gln; His
Аспарагиновая кислота	D или Asp	Gln; Asn
Цистеин	C или Cys	Ser; Ala
Глутамин	Q или Gln	Asn
Глутаминовая кислота	E или Glu	Asp; Gln
Глицин	G или Gly	Ala
Гистидин	H или His	Asn; Gln
Изолейцин	I или Ile	Leu; Val
Лейцин	L или Leu	Ile; val
Лизин	K или Lys	Arg; His
Метионин	M или Met	Leu; Ile; Tyr
Фенилаланин	F или Phe	Tyr; Met; Leu
Пролин	P или Pro	Ala
Серин	S или Ser	Thr
Треонин	T или Thr	Ser
Триптофан	W или Trp	Tyr; Phe
Тирозин	Y или Tyr	Trp; Phe
Валин	V или Val	Ile; Leu

[0034] Если специально не определено где-либо еще в этом документе, все другие технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют значение, общепринятое для специалиста в области техники, к которой относится это изобретение.

[0035] Используемые в данном документе, включая прилагаемую формулу изобретения, формы единственного числа слов включают их соответствующие отсылки на формы множественного числа, если контекст явно не предписывает иное.

[0036] Термин «или» используется в значении и используется взаимозаменяемо с термином «и/или», если контекст явно не предписывает иное.

[0037] В данном описании и в последующей формуле изобретения, если контекст

не требует иного, слово «содержат» и такие варианты, как «содержит» и «содержащий», следует понимать как подразумевающее включение указанной аминокислотной последовательности, последовательности ДНК, стадии или их группы, но не исключение какой-либо другой аминокислотной последовательности, последовательности ДНК, стадии. При использовании в данном документе термин «содержащий» может быть заменен термином «содержащий в себе», «включающий» или иногда «имеющий».

[0038] Термин «Tigit» включает различные изоформы млекопитающих, например, Tigit человека, ортологи Tigit человека и аналоги, содержащие по меньшей мере один эпитоп в пределах Tigit. Аминокислотная последовательность Tigit, например Tigit человека, и нуклеотидная последовательность, кодирующая ее, известны в данной области.

[0039] Термины «введение», «лечение» и «обработка», используемые в данном документе, применительно к животному, человеку, субъекту экспериментального исследования, клетке, ткани, органу или биологической жидкости означают контакт экзогенного фармацевтического, терапевтического, диагностического агента или композиции с животным, человеком, субъектом, клеткой, тканью, органом или биологической жидкостью. Обработка клетки включает контакт реагента с клеткой, а также контакт реагента с жидкостью, где жидкость контактирует с клеткой. Термин «введение» или «обработка» также включает обработку *in vitro* и *ex vivo*, например клетки, с помощью реагента, диагностического агента, связывающего соединения или другой клетки. Термин «субъект» в данном документе относится к любому организму, предпочтительно животному, более предпочтительно млекопитающему (например, крысе, мыши, собаке, кошке, кролику) и наиболее предпочтительно человеку.

Антитело или молекула антитела

[0040] В данном документе раскрыты молекулы антител, которые связываются с Tigit с высокой аффинностью и специфичностью.

[0041] В некоторых вариантах осуществления анти-Tigit антитело связывается с Tigit человека и включает по меньшей мере одну, две, три, четыре, пять или шесть областей, определяющих комплементарность (CDR), содержащих аминокислотную последовательность SEQ ID NO 3, 4, 5, 13 или SEQ ID NO: 6, 7, 8. В конкретных вариантах

осуществления антитело согласно настоящей заявке содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую одну, две или три CDR, имеющие аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 3, 4, 5 или 13, или ее вариант, содержащий одну или более консервативных замен; и/или переменную область легкой цепи (VL), содержащую одну, две или три CDR, имеющие аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 6, 7 или 8, или ее вариант, содержащий одну или более консервативных замен.

[0042] В некоторых вариантах осуществления анти-Tigit антитело представляет собой выделенное антитело, гуманизованное антитело, химерное антитело или рекомбинантное антитело.

[0043] В некоторых вариантах осуществления анти-Tigit антитело содержит по меньшей мере один антигенсвязывающий сайт или по меньшей мере переменную область. В некоторых вариантах осуществления анти-Tigit антитело содержит антигенсвязывающий фрагмент, полученный из антитела, описанного в данном документе.

[0044] Термин «антитело» в данном документе используется в самом широком смысле и конкретно охватывает антитела (включая полноразмерные моноклональные антитела) и фрагменты антител, при условии, что они распознают антиген, например Tigit. Антитело обычно является моноспецифичным, но также может быть описано как идиоспецифичное, гетероспецифичное или полиспецифичное. Молекулы антител связываются посредством специфических сайтов связывания со специфическими антигенными детерминантами или эпитопами на антигенах.

[0045] Термин «моноклональное антитело», или «mAb», или «Mab» в данном документе означает популяцию по существу гомогенных антител, то есть молекулы антитела, содержащиеся в этой популяции, идентичны по аминокислотной последовательности, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Напротив, традиционные (поликлональные) препараты антител обычно включают множество различных антител, имеющих разные аминокислотные последовательности в их переменных доменах, особенно их областях, определяющих комплементарность (CDR), которые часто специфичны для разных эпитопов. Определение "моноклональное" указывает на то, что антитело получено из по существу гомогенной популяции антител; его не следует

интерпретировать как требующее получения антитела посредством какого-либо конкретного способа. Моноклональные антитела (mAb) могут быть получены способами, известными специалистам в данной области. См., например, Kohler G et al., *Nature*, 1975, 256: 495-497; U.S. Pat. No. 4,376,110; Ausubel FM et al., *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY* 1992; Harlow E et al., *ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL*, Cold spring Harbor Laboratory 1988; и Colligan JE et al., *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY* 1993. Раскрываемые в данном документе mAb могут относиться к любому классу иммуноглобулинов, включая IgG, IgM, IgD, IgE, IgA, и любому их подклассу. Гибридому, продуцирующую mAb, можно культивировать *in vitro* или *in vivo*. Высокие титры mAb могут быть получены производством *in vivo*, когда клетки из отдельных гибридом вводят внутривенно мышам, таким как мыши Balb/c, которым предварительно вводили пристан, для получения асцитической жидкости, содержащей высокие концентрации желаемых mAb. MAb изотипа IgM или IgG могут быть очищены от таких асцитических жидкостей или от культуральных супернатантов с помощью методов колоночной хроматографии, хорошо известных специалистам в данной области.

[0046] Как правило, структурная единица основного антитела включает тетрамер. Каждый тетрамер включает две идентичные пары полипептидных цепей, каждая из которых имеет одну «легкую цепь» (около 25 кДа) и одну «тяжелую цепь» (около 50-70 кДа). Аминоконцевая часть каждой цепи включает вариабельную область из от около 100 до 110 или более аминокислот, главным образом ответственных за распознавание антигена. Карбоксиконцевая часть тяжелой цепи может определять константную область, главным образом ответственную за эффекторную функцию. Обычно легкие цепи человека классифицируют как легкие цепи каппа и лямбда. Кроме того, человеческие тяжелые цепи обычно классифицируют как α , δ , ϵ , γ или μ и определяют изотипы антитела как IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, соответственно. Внутри легкой и тяжелой цепей вариабельные и константные области соединены областью «J» из около 12 или более аминокислот, при этом тяжелая цепь также включает область «D» из еще около 10 аминокислот.

[0047] Вариабельные области каждой пары легкая/тяжелая цепь (VL/VH) образуют сайт связывания антитела. Таким образом, в общем, интактное антитело имеет два сайта связывания. За исключением бифункциональных или биспецифических антител, два сайта связывания, обычно, являются одинаковыми.

[0048] Как правило, вариабельные домены как тяжелой, так и легкой цепей содержат три гипервариабельные области, также называемые «областями, определяющими комплементарность (CDR)», которые расположены между относительно консервативными каркасными областями (FR). CDR обычно выровнены по каркасным областям, что позволяет связываться с конкретным эпитопом. Как правило, от N-конца к C-концу вариабельные домены как легкой, так и тяжелой цепи последовательно включают FR-1 (или FR1), CDR-1 (или CDR1), FR-2 (FR2), CDR-2 (CDR2), FR-3 (или FR3), CDR-3 (CDR3) и FR-4 (или FR4). Присваивание аминокислот каждому домену, в общем, соответствует определениям в Sequences of Proteins of Immunological Interest, Kabat, et al., National Institutes of Health, Bethesda, Md.; 5 ed.; NIH Publ. No. 91-3242 (1991); Kabat (1978) Adv. Prot. Chem. 32: 1-75; Kabat et al., (1977) J. Biol. Chem. 252:6609-6616; Chothia, et al, (1987) J Mol. Biol. 196: 901-917 или Chothia et al. (1989) Nature 342: 878-883.

[0049] Термин «гипервариабельная область» означает аминокислотные остатки антитела, которые отвечают за связывание с антигеном. Гипервариабельная область содержит аминокислотные остатки из «CDR» (т. е. VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3 в вариабельном домене легкой цепи и VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3 в вариабельном домене тяжелой цепи). См. Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (определение областей CDR антитела по последовательности); см. также Chothia and Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917 (определение областей CDR антитела по структуре). Термин «каркасные» или «FR» остатки означает такие остатки вариабельного домена, которые отличаются от остатков гипервариабельной области, определенных в данном документе как остатки CDR.

[0050] Если не указано иное, «фрагмент антитела» или «антигенсвязывающий фрагмент» означает антигенсвязывающие фрагменты антител, то есть фрагменты антител, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном, связанным полноразмерным антителом, например фрагменты, которые сохраняют один или более областей CDR. Примеры антигенсвязывающих фрагментов включают, но не ограничиваются, фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv; диатела; линейные антитела; молекулы одноцепочечных антител, например одноцепочечные Fv (ScFv); нанотела и мультиспецифичные антитела, образованные из фрагментов антител.

[0051] Антитело, которое специфично связывается с определенным белком-мишенью, также описывается как специфически связывающееся с определенным белком-мишенью. Это означает, что антитело проявляет преимущественное связывание с этой мишенью по сравнению с другими белками, но эта специфичность не требует абсолютной специфичности связывания. Антитело считается «специфичным» в отношении его предполагаемой мишени, если его связывание позволяет определить присутствие белка-мишени в образце, например, без получения нежелательных результатов, таких как ложноположительные результаты. Антитела или их связывающие фрагменты, используемые в настоящем изобретении, будут связываться с белком-мишенью с аффинностью, которая по меньшей мере в два раза выше, предпочтительно по меньшей мере в 10 раз выше, более предпочтительно по меньшей мере в 20 раз выше и наиболее предпочтительно по меньшей мере в 100 раз выше, чем аффинность к нецелевым белкам. Антитело в данном документе заявлено как специфически связывающееся с полипептидом, содержащим данную аминокислотную последовательность, например аминокислотную последовательность зрелой молекулы Tigit человека, если оно связывается с полипептидами, содержащими эту последовательность, но не связывается с белками, в которых эта последовательность отсутствует.

[0052] Выражения «рН-зависимое связывание», «рН-зависимое связывание с мишенью» и «рН-зависимое связывание с антигеном» являются взаимозаменяемыми в настоящем раскрытии, и указывают, что антитело согласно настоящей заявке связывается с его мишенью/антигеном, а именно TIGIT человека, зависимым от рН образом. В частности, антитело согласно настоящей заявке проявляет более высокую аффинность связывания и/или сигнал связывания со своим антигеном при слабо кислотном рН, например рН 6,0, которое обычно наблюдается в микроокружении опухоли, по сравнению с аффинностью связывания и/или сигналом связывания при физиологическом значении рН, например рН 7,4. Способы определения аффинности связывания и/или интенсивности сигнала связывания антитела согласно настоящей заявке хорошо известны в данной области и включают, но не ограничиваются, поверхностный плазмонный резонанс (Biacore) или аналогичную технологию. Более конкретно, антитело согласно настоящей заявке имеет соотношение K_D при рН 7,4/рН 6,0 более 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90,

100 или более, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (Biacore) или подобной технологией. Альтернативно или дополнительно, антитело согласно настоящей заявке имеет значение R_{max} (RU) при pH 6,0, которое по меньшей мере в 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз выше, чем R_{max} при pH 7,4, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (Biacore) или аналогичной технологии. Аффинность связывания антитела можно измерить при 25 или 37 °C. Было обнаружено, что микроокружение опухоли имеет относительно более кислое значение pH, чем физиологическое состояние или нормальные ткани (Zhang et al. Focus on molecular Imaging 2010; Tannock and Rotin et al. Cancer Res 1989). Следовательно, антитело согласно настоящей заявке, имеющее вышеупомянутое pH-зависимое связывание, является эффективным в качестве анти-TIGIT терапевтического агента для нацеливания на TIGIT-положительные лимфоциты в микроокружении опухоли с селективностью и меньшей токсичностью, связанной с активацией периферических лимфоцитов.

[0053] Термин «человеческое антитело» в данном документе означает антитело, которое содержит только последовательности белка иммуноглобулина человека. Человеческое антитело может содержать мышинные углеводные цепи, если продуцируется в мышце, в клетке мышцы или в гибридоме, полученной из клетки мышцы. Аналогично, «мышинное антитело» или «крысиное антитело» означает антитело, которое содержит только последовательности белка иммуноглобулина мышцы или крысы, соответственно.

[0054] Термин «гуманизованное антитело» означает формы антител, которые содержат последовательности нечеловеческих антител (например, мышинных), а также человеческих антител. Такие антитела содержат минимальную последовательность, полученную из нечеловеческого иммуноглобулина. В общем, гуманизованное антитело будет содержать по существу все из по меньшей мере одного, и обычно двух, переменных доменов, в которых все или по существу все гиперпеременные петли соответствуют петлям нечеловеческого иммуноглобулина, и все или по существу все FR области соответствуют таким областям последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизованное антитело необязательно также содержит по меньшей мере часть константной области (Fc) иммуноглобулина, обычно иммуноглобулина человека. Префикс «hum», «hu», «Hu» или «h» добавляют к обозначениям клонов антител, когда это

необходимо, чтобы отличать гуманизированные антитела от исходных антител грызунов. Гуманизированные формы антител грызунов обычно содержат те же последовательности CDR исходных антител грызунов, хотя некоторые аминокислотные замены могут быть включены для увеличения аффинности, увеличения стабильности гуманизированного антитела или по другим причинам.

[0055] Антитело согласно настоящей заявке имеет потенциальные терапевтические применения при лечении рака. Термин «рак» или «опухоль» в данном документе означает или описывает физиологическое состояние у млекопитающих, которое обычно характеризуется нерегулируемым ростом клеток. Примеры рака включают, но не ограничиваются, рак легкого (включая мелкоклеточный рак легкого или немелкоклеточный рак легкого), рак надпочечника, рак печени, рак желудка, рак шейки матки, меланому, рак почки, рак молочной железы, колоректальный рак, лейкоз, рак мочевого пузыря, рак кости, рак головного мозга, рак эндометрия, рак головы и шеи, лимфому, рак яичников, рак кожи, опухоль щитовидной железы или метастатическое поражение раком.

[0056] Кроме того, антитело согласно настоящей заявке имеет потенциальные терапевтические применения для борьбы с вирусными инфекциями и другими заболеваниями человека, которые механически связаны с иммунной толерантностью или «истощением». В контексте настоящей заявки термин «истощение» относится к процессу, который приводит к истощению способности иммунных клеток реагировать на инфицирующий вирус во время длительного периода хронической вирусной инфекции.

Фармацевтические композиции и наборы

[0057] В некоторых аспектах это раскрытие относится к композициям, например, фармацевтически приемлемым композициям, которые включают анти-Tigit-3 антитело, описанное в настоящем документе, составленное вместе с по меньшей мере одним фармацевтически приемлемым эксципиентом. Используемый в настоящем документе термин «фармацевтически приемлемый эксципиент» включает любые и все растворители, дисперсионные среды, изотонические и задерживающие абсорбцию агенты и тому подобное, которые являются физиологически совместимыми. Эксципиент может быть подходящим для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального,

ректального, спинального или эпидермального введения (например, путем инъекции или инфузии).

[0058] Композиции согласно настоящему изобретению могут находиться в различных формах. Они включают, например, жидкие, полутвердые и твердые лекарственные формы, такие как жидкие растворы (например, растворы для инъекций и инфузии), дисперсии или суспензии, липосомы и суппозитории. Подходящая форма зависит от предполагаемого способа введения и терапевтического применения. Типичные подходящие композиции находятся в форме растворов для инъекции или инфузии. Одним подходящим способом введения является парентеральный (например, внутривенный, подкожный, внутрибрюшинный, внутримышечный). В некоторых вариантах осуществления антитело вводят путем внутривенной инфузии или инъекции. В некоторых вариантах осуществления антитело вводят путем внутримышечной или подкожной инъекции.

[0059] Термин «терапевтически эффективное количество», используемый в настоящем документе, относится к количеству антитела, которое при введении субъекту для лечения заболевания или расстройства или по меньшей мере одного из клинических симптомов заболевания или расстройства является достаточным для осуществления такого лечения заболевания, расстройства или симптома. «Терапевтически эффективное количество» может варьироваться в зависимости от антитела, заболевания, расстройства и/или симптомов заболевания или расстройства, степени тяжести заболевания, расстройства и/или симптомов заболевания или расстройства, возраста субъекта, подлежащего лечению, и/или веса субъекта, подлежащего лечению. Подходящее количество в любом указанном случае может быть очевидным для специалистов в данной области или может быть определено путем проведения рутинных экспериментов. В случае комбинированной терапии «терапевтически эффективное количество» относится к общему количеству активных агентов, содержащихся в комбинации для эффективного лечения заболевания, расстройства или состояния.

[0060] «Субъект», используемый в настоящем документе, представляет собой млекопитающее, например грызуна или примата, предпочтительно высшего примата, например человека (например, пациента, имеющего или подверженного риску заболевания, описанного в настоящем документе).

ПРИМЕР

Пример 1. Получение анти-Tigit моноклонального антитела

[0061] Анти-Tigit моноклональные антитела (mAb) получали на основе традиционной технологии слияния гибридом [de StGroth and Sheidegger, 1980 J Immunol Methods 35: 1; Mechetner, 2007 Methods Mol Biol 378: 1] с небольшими модификациями. Для дальнейшей характеристики отбирали mAb с высокой активностью связывания, полученной в результате иммуноферментного анализа (ELISA) и анализа сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS).

[0062] Рекомбинантный белок Tigit для анализа иммунизации и связывания

[0063] кДНК, кодирующую полноразмерный Tigit человека (SEQ ID NO: 1), синтезировали и приобретали у Sino Biological (Beijing, China) на основе её последовательности GenBank (номер доступа: NM_173799). Кодировующую область внеклеточного домена (ECD) полноразмерного Tigit человека, соответствующую аминокислоте (AA) 1-141 SEQ ID NO: 1, амплифицировали с помощью ПЦР (полимеразная цепная реакция) и клонировали в вектор экспрессии на основе pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) с C-концом, слитым либо с Fc-доменом мышинового IgG2a, либо с Fc-доменом тяжелой цепи IgG1 человека, что приводит к получению двух плазмид для экспрессии рекомбинантного слитого белка, Tigit-mIgG2a и Tigit-huIgG1, соответственно. Схематическое изображение слитых белков Tigit показано на фиг. 1. Для получения рекомбинантного слитого белка плазмиды Tigit-mIgG2a и Tigit-huIgG1 временно трансфицировали в клетки 293G (разработанные собственными силами) и культивировали в течение 7 дней в CO₂-инкубаторе, оборудованном вращающимся шейкером. Супернатант, содержащий рекомбинантный белок, собирали и очищали центрифугированием. Tigit-mIgG2a и Tigit-huIgG1 очищали с использованием колонки с белком А (Cat.: 17127901, GE Life Sciences). Оба белка Tigit-mIgG2a и Tigit-huIgG1 подвергали диализу против забуференного фосфатом солевого раствора (DPBS) и хранили в морозильной камере при -80 °C в небольших аликвотах.

[0064] Клеточные линии со стабильной экспрессией

[0065] Для создания стабильных клеточных линий, которые экспрессируют полноразмерный Tigit человека (huTigit) или Tigit обезьяны (mkTigit, учетный №: ХМ_005548101.2), гены Tigit (синтезированные Genescript, Nanjing, China) клонировали в

ретровирусный вектор pFB-Neo (Cat.: 217561, Agilent, USA). Двухтропные ретровирусные векторы получали в соответствии с предыдущим протоколом [Zhang T, et al. 2005, Blood]. Векторы, содержащие huTigit и mkTigit, трансдуцировали в клетки Jurkat и NK92MI (ATCC, Manassas, VA, USA), соответственно, для генерации клеточных линий Jurkat/huTigit и NK92MI/mkTigit. Клеточные линии с высокой экспрессией отбирали путем культивирования в среде с G418 и анализом связывания FACS.

[0066] Иммунизация, гибридомное слияние и клонирование

[0067] Мышей Balb/c возрастом от восьми до двенадцати недель (от НФК BIOSCIENCE CO., LTD, Beijing, China) иммунизировали внутрибрюшинно (i.p.) 100 мкл антигенной смеси, содержащей 10 мкг Tigit-mIgG2a и водорастворимый адъювант (Cat.: KX0210041, KangBiQuan, Beijing, China). Процедуру повторяли через три недели. Через две недели после 2-й иммунизации сыворотки мыши оценивали на связывание с Tigit с помощью ELISA и FACS. Через десять дней после скрининга сыворотки мышей с наивысшими титрами сыворотки анти-Tigit антител стимулировали путем внутрибрюшинной инъекции 50 мкг Tigit-mIgG2a. Через три дня после стимулирования спленциты выделяли и сливали с клеточной линией мышинной миеломы, клетками SP2/0 (ATCC), используя стандартные методики [1977, Somat Cell Genet, 3: 231].

[0068] Оценка активности связывания с Tigit антител с помощью ELISA и FACS

[0069] Супернатанты гибридных клонов первоначально исследовали с помощью ELISA, как описано в «Methods in Molecular Biology (2007) 378: 33-52» с некоторыми модификациями. Вкратце, белок Tigit-huIgG1 наносили в 96-луночные планшеты. Антимышиное IgG-антитело, связанное с HRP (пероксидаза хрена, Cat.: 7076S, Cell Signaling Technology, USA), и субстрат (Cat.: 00-4201-56, eBioscience, USA) использовали для получения сигнала поглощения цвета на длине волны 450 нм, который измеряли с помощью планшет-ридера (SpectraMax Paradigm, Molecular Devices, USA). ELISA-положительные клоны дополнительно проверяли с помощью FACS с использованием клеток NK92MI/huTigit или NK92mi/mkTigit, описанных выше. Tigit-экспрессирующие клетки (10^5 клеток/лунку) инкубировали с ELISA-положительными супернатантами гибридом с последующим связыванием с козьим антимышиным IgG-антителом, меченным Alexa Fluoro-647 (Cat.: A0473, Beyotime Biotechnology, China). Флуоресценцию клеток определяли количественно с

использованием проточного цитометра (Guava easyCyte 8HT, Merck-Millipore, USA).

[0070] Кондиционированные среды из гибридом, которые показали положительные сигналы при скрининге как с помощью ELISA, так и с помощью FACS, подвергали функциональным анализам для выявления антител с хорошей функциональной активностью, показанной в анализах на основе иммунных клеток человека (см. следующие разделы). Антитела с желаемой функциональной активностью дополнительно субклонировали и охарактеризовывали.

[0071] Субклонирование и адаптация гибридом к бессывороточной среде или среде с низким содержанием сыворотки

[0072] После первичного скрининга с помощью ELISA, FACS и функциональных анализов, как описано выше, положительные клоны гибридомы субклонировали путем предельного разведения. Три положительных субклона на основе скрининга ELISA и FACS из каждого планшета отбирали и охарактеризовывали с помощью функциональных анализов. Лучшие субклоны антител, подтвержденные с помощью функциональных анализов, адаптировали для роста в среде CDM4MAb (Cat.: SH30801.02, Hyclone, USA) с 3% FBS.

[0073] Экспрессия и очистка моноклональных антител

[0074] Клетки гибридомы или клетки 293G, временно трансфицированные плазмидой для экспрессии антител (Cat. No. R79007, Invitrogen), культивировали либо в среде CDM4MAb (Cat.: SH30801.02, Hyclone), либо в экспрессионной среде Freestyle™ 293 (Cat.: 12338018, Invitrogen) и инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 5-7 дней при 37 °C. Кондиционированную среду собирали центрифугированием и фильтровали пропусканием через 0,22 мкм мембрану перед очисткой. Мышиные или рекомбинантные антитела, содержащие супернатанты, наносили и связывали с колонкой с белком А (Cat.:17127901, GE Life Sciences) в соответствии с руководством производителя. Процедура обычно давала антитела с чистотой выше 90 %. Аффинно очищенные антитела к белку А либо подвергали диализу против PBS (фосфатно-солевой буфер), либо дополнительно очищали с использованием колонки HiLoad 16/60 Superdex200 (Cat.: 17531801, GE Life Sciences) для удаления агрегатов. Концентрации белков определяли путем измерения поглощения при 280 нм. Конечные препараты антител хранили в аликвотах в морозильной камере при -80 °C.

Пример 2. Клонирование и анализ последовательности антител к Tigit

[0075] Клоны мышинной гибридомы собирали для получения всей содержащейся в клетках РНК с использованием набора Ultrapure RNA (Cat.: 74104, QIAGEN, Germany) на основании протокола производителя. Первую нить кДНК синтезировали с использованием набора для синтеза кДНК от Invitrogen (Cat.: 18080-051) и проводили ПЦР-амплификацию нуклеотидных последовательностей, кодирующих переменную область тяжелой цепи (Vh) и переменную область цепи каппа (Vk) мышинных mAb, с использованием набора для ПЦР (Cat.: CW0686, CWBio, Beijing, China). Олигопраймеры, используемые для клонирования кДНК Vh и Vk антитела, синтезировали Invitrogen (Beijing, China) на основе последовательностей, описанных ранее (Brocks et al. 2001 Mol Med 7: 461). ПЦР-продукты затем субклонировали в вектор клонирования pEASY-Blunt (Cat.: C B101-02, TransGen, China) и секвенировали в Genewiz (Beijing, China). Аминокислотные последовательности областей Vh и Vk выводили из результатов секвенирования ДНК.

[0076] Мышиные mAb анализировали путем сравнения гомологии последовательностей и группировали на основании сходства последовательностей (фиг. 2). Области, определяющие комплементарность (CDR), определяли согласно системе Кабата [Wu and Kabat 1970 J. Exp. Med. 132: 211-250] и базе данных IMGT [Lefranc 1999 Nucleic Acids Research 27: 209-212] с помощью аннотации последовательности и анализа последовательности через Интернет (http://www.imgt.org/IMGT_vquest/share/textes/index.HTML). Аминокислотные последовательности типичного лучшего клона mu1217 (Vh и Vk) перечислены в таблице 1 (SEQ ID NO: 9 и 11). Последовательности CDR mu1217 перечислены в таблице 2 (SEQ ID NO: 3-8).

[0077] Таблица 1. Аминокислотные последовательности Vh и Vk областей mu1217

mu1217 Vh	SEQ ID NO: 9
mu1217 Vk	SEQ ID NO: 11

[0078] Таблица 2. CDR последовательности (аминокислотные) Vh и Vk областей

mu1217

mAbs	CDR1	CDR2	CDR3
mu1217, Vh	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 5
mu1217, Vk	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8
Примечание: последовательности CDR определяются в соответствии с системой Кабата			

Пример 3. Определение аффинности очищенных мышинных анти-Tigit антител с помощью SPR

[0079] Антитела к Tigit с высокой активностью связывания по данным ELISA и FACS, а также с высокими функциональными активностями, полученными с помощью клеточных анализов (описанных в примерах 1 и 2), охарактеризовывали по их кинетике связывания с помощью анализов SPR с использованием BIAcore™ T-200 (GE Life Sciences). Вкратце, антитело против человеческого IgG иммобилизовали на активированном биосенсорном чипе CM5 (Cat. №: BR100530, GE Life Sciences). Fc-меченый Tigit человека заливался по поверхности чипа и захватывался антителом против человеческого IgG. Затем последовательно разбавленные (0,12 нМ до 10 нМ) очищенные мышинные антитела заливали по поверхности чипа и анализировали изменения сигналов поверхностного плазмонного резонанса для расчета скоростей ассоциации (k_{on}) и скоростей диссоциации (k_{off}) с помощью модели связывания Ленгмюра один к одному (BIA Evaluation Software, GE Life Sciences). Равновесную константу диссоциации (K_D) рассчитывали как отношение k_{off}/k_{on} . Профили аффинности связывания лучших mAb, включая mu1217, mu1257, mu1226 и mu242, показаны на фиг. 3 и в таблице 3.

[0080] Таблица 3. Аффинность связывания гибридомных антител, определяемые с помощью SPR

Антитела	k_{on} ($M^{-1}c^{-1}$)	k_{off} (c^{-1})	K_D (нМ)
mu1217	4,33E+06	3,96E-05	9,15E-12
mu1257	3,99E+06	4,20E-05	1,05E-11

mu1266	1,07E+07	8,49E-05	7,94E-12
mu242	5,12E+06	7,13E-05	1,39E-11

Пример 4. Гуманизация мышинового анти-Tigit человека mAb mu1217

[0081] Гуманизация и инженерия mAb

[0082] Для гуманизации mu1217 в генах зародышевой линии человеческого IgG проводили поиск последовательностей, которые обладают высокой степенью гомологии с последовательностями кДНК переменных областей mu1217, путем "бластинга" (англ. blasting - поиск при помощи BLAST) базы данных генов человеческого иммуноглобулина на сайтах IMGT (http://www.imgt.org/IMGT_vquest/share/textes/index.html) и NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>). Гены IGVH и IGVK человека, которые присутствуют в спектре антител человека с высокой частотой (Glanville2009 PNAS 106: 20216-20221) и которые высоко гомологичны с mu1217, выбрали в качестве матриц для гуманизации.

[0083] Гуманизацию осуществляли посредством CDR-прививки (Methods in Molecular Biology, Vol. 248: Antibody Engineering, Methods and Protocols, Humana Press), и гуманизированные антитела (hu1217s) конструировали в виде человеческого IgG1mf с использованием разработанного собственными силами вектора экспрессии. На начальном этапе гуманизации мутации от мышинных до человеческих аминокислотных остатков в каркасных областях основывались на моделированной трехмерной структуре, и мышинные каркасные остатки, имеющие структурное значение для поддержания канонических структур CDR, сохраняли в 1-й версии гуманизированного антитела 1217 (hu1217-1-1 с шестью CDR, имеющими аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3, 13, 5 (CDR тяжелой цепи) и SEQ ID NO: 6, 7, 8 (CDR легкой цепи), переменной областью тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14 и кодируемой нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 15, и переменной областью легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16 и кодируемой нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 17). В частности, CDR V_κ mu1217 (SEQ ID NO: 6-8) привили в каркас переменной гена человеческой зародышевой линии IGV_κ3-15 с сохранением одного остатка мышинной каркасной области (V₅₈), что привело к получению гуманизированной последовательности V_κ Hu1217-1-1 (SEQ ID NO: 16 для аминокислотной последовательности и SEQ ID NO: 17 для нуклеотидной

последовательности). N-конец H-CDR2 (SEQ ID NO: 4), H-CDR1 и H-CDR3 (SEQ ID NO: 3 и 5) Vh mu1217 привили в каркас варибельного гена человеческой зародышевой линии IGVH3-7 с сохранением двух остатков мышинового каркаса (T₂₄ и I₃₇ SEQ ID NO: 10). В гуманизованных вариантах hu1217 привили только N-концевую половину H-CDR2 по Кабату, так как только N-концевую половину предсказывали в качестве важной для связывания антигена в соответствии с моделируемой трехмерной структурой. Аминокислотная последовательность и нуклеотидная последовательность полученной гуманизованной последовательности Vh Hu1217-1-1 показаны в SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15, соответственно.

[0084] Hu1217-1-1 конструировали в виде полноразмерного антитела человека с использованием разработанных своими силами экспрессирующих векторов, которые содержат константные области варианта человеческого IgG1, обозначенного как IgG1mf (SEQ ID NO: 18), и цепи каппа, соответственно, с легко адаптирующимися сайтами для субклонирования. Экспрессию и получение антитела hu1217-1-1 осуществляли путем котрансфекции двух указанных выше конструкций в клетки 293G и очистки с использованием колонки с белком А (Cat.:17543802, GE Life Sciences). Очищенные антитела концентрировали до 0,5-5 мг/мл в PBS и хранили аликвотами в морозильной камере при -80 °C.

[0085] На основании матрицы hu1217-1-1, авторы изобретения сделали несколько одиночных мутаций, превращающих оставшиеся мышинные остатки в каркасной области V_κ в соответствующие остатки человеческой зародышевой линии, которые включают V58I в V_κ и в T24A и I37V V_h. Все полученные hu1217-2A-1 (T24A), hu1217-2B-1 (I37V) и hu1217-1-2a (V58I) имели схожее связывание и функциональные активности с hu1217-1-1. Все мутации, направленные на гуманизацию, осуществляли с использованием праймеров, содержащих мутации в определенных положениях, и набора для сайт-направленного мутагенеза (Cat. No. FM111-02, TransGen, Beijing, China). Желаемые мутации подтверждали с помощью анализа секвенирования. Эти варианты антител, полученные из hu1217, анализировали с помощью анализов связывания и функциональности, как описано ранее.

[0086] Антитела Hu1217 дополнительно подвергали инжинирингу путем введения мутаций в CDR и каркасные области для улучшения молекулярных и

биофизических свойств для терапевтического применения для человека. Факторы, которые нужно учитывать, включают аминокислотные составы, термостабильность (T_m), поверхностную гидрофобность и изоэлектронные точки (pIs) при сохранении функциональной активности.

[0087] В совокупности, хорошо сконструированную версию гуманизованного моноклонального антитела hu1217-2-2 (SEQ ID NO: 3, 5-8, 13 и 19-21) получали с помощью мутационного процесса, описанного выше, и охарактеризовывали более подробно. Результаты показали, что и hu1217-2-2, и hu1217-1-1 были очень схожи в отношении аффинности связывания и функциональных активностей, таких как ингибирование Tigit-опосредованной передачи сигналов вниз по течению.

[0088] Для определения аффинности антитела улавливали на поверхности, захватывающей человеческий Fc, и использовали при анализе аффинности на основе технологии поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Результаты SPR-определенных профилей связывания анти-Tigit антител суммированы в таблице 4. Hu1217-2-2 и hu1217-1-1 показали очень схожие профили связывания со средней константой диссоциации при 0,415 нМ и 0,266 нМ, соответственно, которые близки к таковой у ch1217.

[0089] Таблица 4. Аффинности связывания антител hu1217, определяемые с помощью SPR

Антитела	Тест 1			Тест 2			Среднее K _D (нМ)
	k _{on} (M ⁻¹ c ⁻¹)	k _{off} (c ⁻¹)	K _D (нМ)	k _{on} (M ⁻¹ c ⁻¹)	k _{off} (c ⁻¹)	K _D (нМ)	
ch1217*	1,56×10 ⁶	4,43×10 ⁻⁴	0,283	-	-	-	NA**
hu1217-1-1	1,45×10 ⁶	4,48×10 ⁻⁴	0,309	1,33×10 ⁶	6,94×10 ⁻⁴	0,520	0,415
hu1217-2-2	1,80×10 ⁵	2,29×10 ⁻⁴	0,127	1,50×10 ⁶	6,08×10 ⁻⁴	0,404	0,266

* ch1217 состоит из переменных доменов mu1217, слитых с константными областями человеческого IgG1mf/каппа

** NA: данные отсутствуют.

[0090] Таблица 5. CDR антител hu1217

Антитела	CDR1	CDR2	CDR3
hu1217-1-1, Vh	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 5
hu1217-2-2, Vh	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 5
hu1217-1-1, Vκ	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8
hu1217-2-2, Vκ	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8

[0091] Все гуманизированные антитела, показанные выше, также исследовали в отношении функциональных активностей на первичных иммунных клетках человека, выделенных у здоровых доноров (описано в Примере 7).

Пример 5. Активности связывания разных версий 1217 с нативным Tigit

[0092] Чтобы оценить активность связывания анти-Tigit антител с нативным Tigit на живых клетках, клетки NK92mi подвергали инжинирингу таким образом, чтобы обеспечить сверхэкспрессию Tigit человека. Живые клетки NK92mi/Tigit высевали в 96-луночный планшет и инкубировали с серией разведений анти-Tigit антител. Козий античеловеческий IgG использовали в качестве вторичного антитела для выявления связывания антитела с клеточной поверхностью. Значения EC₅₀ для дозозависимого связывания с нативным Tigit человека определяли путем подгонки данных доза-ответ к четырехпараметрической логистической модели с помощью GraphPad Prism. Как показано на фиг. 4 и в таблице 6 оба гуманизированных антитела 1217, hu1217-1-1 и hu1217-2-2, показали хорошую аффинность связывания с нативным Tigit на живых клетках.

[0093] Таблица 6. EC₅₀ дозозависимого связывания гуманизированных вариантов 1217 с нативным Tigit

Антитела	EC ₅₀ (мкг/мл)	
	Тест 1	Тест 2
Ch1217	0,100	-
hu1217-1-1	0,114	0,084
hu1217-2-2		0,068

Пример 6. Анти-Tigit антитела блокируют взаимодействия Tigit с его лигандами

PVR и PVR-L2

[0094] Tigit связывается с PVR с высокой аффинностью (K_d : около 1 нМ), что может конкурировать с взаимодействием CD266-PVR [Yu et al., 2009].

[0095] Чтобы определить, могут ли анти-Tigit антитела блокировать взаимодействия Tigit-PVR и Tigit-PVR-L2, клетки HEK293 подвергали инжинирингу таким образом, чтобы обеспечить экспрессию высоких уровней PVR или PVR-L2. Полученные клеточные линии называли HEK293/PVR и HEK293/PVR-L2, соответственно. Связывание растворимого Tigit (слитого белка Tigit-mIgG2a) с PVR или PVR-L2 определяли с помощью проточной цитометрии (фиг. 5A). Блокаду взаимодействия Tigit-лиганд количественно измеряли путем добавления последовательно разбавленных анти-Tigit антител. Как показано на фиг. 5B, hu1217-2-2/IgG1 (гуманизированная версия, содержащая Fc-область IgG1 дикого типа и имеющая те же последовательности VH и VL, что и hu1217-2-2/IgG1mf) и hu1217-2-2/IgG1mf могут блокировать связывание Tigit с PVR дозозависимым образом с IC_{50} при 0,64 и 0,55 мкг/мл, соответственно. Аналогично, IC_{50} hu1217-2-2/IgG1 и hu1217-2-2/IgG1mf при блокировании взаимодействия Tigit-PVR-L2 составляет 0,25 и 0,18 мкг/мл, соответственно.

Пример 7. Активация ЦМВ-специфичных Т-клеток человека анти-Tigit антителами

[0096] Функциональную активность антител к Tigit дополнительно оценивали с использованием Т-клеток естественного происхождения, которые распознают пептид человеческого ЦМВ PP65 (NLVPMVATV, 495-503, HLA-A2.1-рестриктированный) [Boeckh M, Boeckh M and Geballe AP, 2011 J Clin Invest.121: 1673-80]. Вкратце, РВМС от HLA-A2.1⁺ здоровых доноров моделировали пептидом PP65 (> 98 % чистоты, синтезированный GL Biochem, Shanghai) в полном RPMI с 10% FBS в течение недели. РВМС, примированный pp65, использовали в качестве эффекторных клеток. Перед анализом в клетки-мишени, клетки HCT116 (HLA-A2.1⁺, 10⁴), вводили пептид pp65 (5 мкг/мл) в течение 30 минут и совместно культивировали с равным количеством РВМС, сенсibilизированных pp65, в 96-луночной планшете в течение ночи в присутствии или в отсутствии анти-Tigit антител или холостого контроля (только среда). Как показано на фиг. 6, hu1217-2-2/IgG1 стимулировал pp65-специфические Т-клетки на секрецию IFN- γ в супернатанте клеточной культуры дозозависимым образом для обоих доноров.

Пример 8. Анти-Tigit антитела усиливали цитотоксичность, опосредованную НК-клетками

[0097] Известно, что Tigit конститутивно экспрессируется в клетках естественных киллерах (НК) с относительно более высокими уровнями, и взаимодействие между Tigit и его лигандами ингибирует цитотоксичность, опосредованную НК-клетками [Wang F, et al. 2015 Eur. J. Immunology 45: 2886-97; Stanietzky N et al., 2009 Proc Natl Acad Sci USA 106: 17858-63].

[0098] Чтобы подтвердить, могут ли гуманизированные анти-Tigit антитела стимулировать НК-опосредованную цитотоксичность, была разработана линия НК-клеток NK92MI, осуществляющая коэкспрессию как рецепторов Tigit, так и DNAM-1 (NK92MI/Tigit-DNAM-1) в качестве эффекторной клетки посредством ретровирусной трансдукции в соответствии с протоколами, описанными ранее [Zhang et al., 2006 Cancer Res. 66: 5927-5933]. PVR-экспрессирующую клеточную линию рака легкого SK-MES-1/PVR определяли аналогично в качестве мишени.

[0099] Цитотоксичность клеток NK92MI/Tigit-DNAM-1 в отношении клеток SK-MES-1/PVR определяли с помощью анализа высвобождения LDH с использованием набора для анализа нерадиоактивной цитотоксичности CytoTox 96 (Promega, Madison, WI). Вкратце, клетки NK92MI/Tigit-DNAM-1 (8×10^5) совместно культивировали с клетками SK-MES-1/PVR (2×10^4) в присутствии анти-Tigit Abs (0,007-30 мкг/мл) в течение 5 часов в 96-луночных V-образных планшетах. Специфический лизис с помощью анализа высвобождения LDH определяли с использованием следующего уравнения: процент специфического лизиса = [(экспериментальный - спонтанный для эффекторных клеток - спонтанный для клеток-мишеней)/(максимальный для клеток-мишеней - спонтанный для клеток-мишеней)] \times 100. Результаты показали, что анти-Tigit антитела hu1217-2-2/IgG1mf усиливают уничтожение НК-клеток дозозависимым образом (EC_{50} : 0,185 мкг/мл) (фиг. 7).

Пример 9. Анти-Tigit антитела могут снижать поверхностную экспрессию рецептора Tigit через FcγR-опосредованный трогицитоз.

[00100] Трогицитоз представляет собой явление, при котором молекулы клеточной поверхности переносятся из донорных клеток в акцепторные клетки [Joly E, et al. 2003 Nat.

Immunol; Machlenkin A, et al. 2008 Cancer Res.; Beum PV et al. 2008 J. Immunol; Rossi EA, et al. 2013 Blood]. Трогоцитоз, вызванный антителом, через Fc γ -рецепторы (Fc γ Rs) приводит к подавлению рецепторов на поверхности клетки [Carlsten M, et al. 2016 Clin Cancer Res; Beum PV, et al. 2011 J. Immunology]. Следовательно, подавление рецептора-мишени с помощью трогоцитоза может вызывать ослабленную передачу сигналов. Принимая во внимание эти наблюдения, существует возможность, что hu1217-2-2/IgG1 может индуцировать трогоцитоз рецептора Tigit в присутствии Fc γ R⁺ клеток, что приводит к снижению поверхностной экспрессии. Чтобы учесть эту возможность, клетки Jurkat/Tigit инкубировали с клетками НЕК, экспрессирующими различные Fc γ Rs (включая Fc γ RIIA_{H131}, Fc γ RIIB, Fc γ RIIA_{V158}), с меченым биотином hu1217-2-2/IgG1wt (гуманизированное антитело, содержащее те же последовательности VL и VH, что и hu1217-2-2/IgG1mf, и Fc область IgG1 дикого типа) или hu1217-2-2/IgG1mf в течение ночи. Поверхностную экспрессию рецептора Tigit определяли с помощью SA-APC (Biolegend). Как показано на фиг. 8, hu1217-2-2/IgG1, но не hu1217-2-2/IgG1mf, вызывал значительное снижение поверхностной экспрессии Tigit по сравнению с клетками, обработанными отрицательным контролем человеческим IgG, что указывает на то, что снижение поверхностного Tigit на клетках Jurkat/Tigit зависит от связывания Fc γ R. Кроме того, присутствие 10% сыворотки человека (содержащей высокий уровень эндогенного IgG) может частично снижать Fc γ RIIA_{H131}- или Fc γ RIIA_{V158}-, но не Fc γ RIIB-опосредованный трогоцитоз рецептора Tigit, предполагая, что Fc γ RIIB может играть критическую роль в снижении поверхностной экспрессии Tigit анти-Tigit mAb (например, hu1217-2-2/IgG1wt) *in vivo*. Эти наблюдения также согласуются с предыдущими результатами [Ganesan LP, et al. 2012 J Immunol 189:4981-8; Taylor RP, et al. 2015 Blood 125: 762-6].

Пример 10. Эффекторные функции ADCC и CDC анти-Tigit антител

[00101] Способность анти-Tigit антител индуцировать ADCC и CDC в первичных РВМС человека определяли с использованием анализа *in vitro*, как описано ниже.

[00102] ADCC с использованием человеческих РВМС в качестве клеток-мишеней

[00103] Осуществляли анализ ADCC на основе проточной цитометрии, чтобы определить, могут ли антитела к Tigit индуцировать ADCC в Tigit⁺ Т-клетках. Линию эффекторных клеток для анализа, клетки NK92MI/CD16V, получали из клеток NK92MI

(АТСС) путем ко-трансдукции экспрессионных плазмид, содержащих CD16_{V158} (аллель V158) и FcR γ кДНК. РВМС человека от здоровых доноров стимулировали с помощью РНА (1 мкг/мл) для положительной регуляции экспрессии Tigit. Как показано на фиг. 9, Т-клетки, включая CD4⁺ эффектор (CD3⁺CD4⁺Foxp3⁻), CD8⁺ и регуляторные Т-клетки (CD4⁺Foxp3⁺), все экспрессировали значительные количества Tigit. Эти активированные РВМС (от 3 здоровых доноров) использовали в качестве клеток-мишеней. Клетки NK92MI/CD16V, меченные флуоресцентным красителем CFSE, (5×10^4) совместно культивировали с равным количеством клеток-мишеней в течение 40 часов в присутствии антител к Tigit (hu1217-2-2/IgG1mf или hu1217-2-2/IgG1wt, 30 мкг/мл) или контрольных антител (положительный контроль анти-CD3 антитело ОКТ3 (5 мкг/мл, Biolegend) или отрицательный контроль человеческий IgG, 30 мкг/мл). По сравнению с человеческим IgG и hu1217-2-2/IgG1mf hu1217-2-2/IgG1wt может привести к умеренному снижению Tregs через ADCC. Однако никаких значительных ADCC эффектов не наблюдалось в общих Т-клетках и CD8⁺ Т-клетках (фиг. 9).

[00104] CDC с использованием человеческих РВМС в качестве клеток-мишеней

[00105] Будет ли hu1217-2-2/IgG1mf и hu1217-2-2/IgG1wt вызывать CDC, определяли с использованием предварительно активированных человеческих РВМС и свежих аутологичных сывороток от здоровых доноров. Клеточный лизис вследствие CDC определяли с помощью набора для анализа Celltiter glo (Promega, Beijing, China). Вкратце, РВМС предварительно активировали с помощью РНА (10 мкг/мл) в течение 3 дней и затем инкубировали в RPMI1640 плюс аутологичная сыворотка (15 %) и анти-Tigit или контрольные антитела (0,01-100 мкг/мл) в течение ночи при 37 °С. Гибель клеток из-за CDC оценивали по уменьшению АТФ (аденозинтрифосфат), высвобождаемого из жизнеспособных клеток после лизиса клеток, в конце реакции. Анти-МНС-I А, В, С использовали в качестве положительного контроля. Считывание флуоресценции проводили с использованием 96-луночного флуорометра (PHERA Star FS, BMG LABTECH), и активности CDC рассчитывали по показаниям относительной флуоресцентной единицы (RFU) следующим образом: % CDC активности = [(тестовая RFU - фоновая RFU)/(RFU при полном лизисе клеток - фоновая RFU)] \times 100. Результаты эксперимента показали, что как hu1217-2-2/IgG1mf, так и hu1217-2-2/IgG1wt не проявляли детектируемой CDC с РВМС, выделенными от двух разных доноров.

Напротив, положительное контрольное антитело, анти-МНС-I, индуцирует значительную CDC активность (фиг. 10).

Пример 11. pH-зависимая аффинность связывания Hu1217-2-2/IgG1

[00106] Чтобы оценить, будет ли pH влиять на свойство связывания hu1217-2-2/IgG1, проводили SPR-тесты на связывание с мишенью в подвижных буферах для сравнения при pH 7,4 и при pH 6,0. Антитело hu1217-2-2/IgG1 иммобилизовали на чипе CM5 (GE). Последовательные разведения TIGIT-his пропускали через иммобилизованный hu1217-2-2/IgG1 в подвижном буфере HBS при pH 7,4 или pH 6,0.

[00107] Как показывают результаты, приведенные в таблице 7 ниже, hu1217-2-2/IgG1 показал более высокую аффинность связывания (K_D) и более сильный сигнал связывания (R_{max}) в отношении TIGIT человека при pH 6,0 (кислотный pH, который аналогичен pH микроокружения опухоли) по сравнению с данными, полученными при pH 7,4 (физиологический pH). Эти результаты указывают на потенциальное преимущество антитела в качестве терапевтического агента, нацеленного на TIGIT-позитивные лимфоциты в опухолевой среде, поскольку hu1217-2-2/IgG1 может более селективно нацеливаться на TIGIT-позитивные лимфоциты в микроокружении опухоли, имея при этом более низкую потенциальную токсичность, связанную с активацией периферических лимфоцитов.

[00108] Таблица 7. Аффинность связывания hu1217-2-2/IgG1 при pH 7,4 и pH 6,0, определенная с помощью SPR

pH	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (M)	R_{max} (RU)
7,4	4,34E+05	9,53E-05	2,19E-10	21
6,0	2,54E+06	7,60E-05	2,99E-11	37

ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

к ответу на уведомление от 02.06.2023

1. Применение антитела, где антитело способно связываться с Т-клеточным иммуноглобулином и доменом ITIM (TIGIT) человека и содержит:

(a) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность VH-CDR1 SEQ ID NO 3, аминокислотную последовательность VH-CDR2 SEQ ID NO 4 и аминокислотную последовательность VH-CDR3 SEQ ID NO 5; и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность VL-CDR1 SEQ ID NO 6, аминокислотную последовательность VL-CDR2 SEQ ID NO 7 и аминокислотную последовательность VL-CDR3 SEQ ID NO 8; или

(b) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность VH-CDR1 SEQ ID NO 3, аминокислотную последовательность VH-CDR2 SEQ ID NO 13 и аминокислотную последовательность VH-CDR3 SEQ ID NO 5; и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность VL-CDR1 SEQ ID NO 6, аминокислотную последовательность VL-CDR2 SEQ ID NO 7 и аминокислотную последовательность VL-CDR3 SEQ ID NO 8, и

содержит константную область тяжелой цепи подкласса IgG1 или его варианта, для лечения рака.

2. Применение антитела, где антитело способно связываться с TIGIT человека и содержит:

(a) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность VH-CDR1 SEQ ID NO 3, аминокислотную последовательность VH-CDR2 SEQ ID NO 4 и аминокислотную последовательность VH-CDR3 SEQ ID NO 5; и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность VL-CDR1 SEQ ID NO 6, аминокислотную последовательность VL-CDR2 SEQ ID NO 7 и аминокислотную последовательность VL-CDR3 SEQ ID NO 8; или

(b) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность VH-CDR1 SEQ ID NO 3, аминокислотную последовательность VH-CDR2 SEQ ID NO 13 и аминокислотную последовательность VH-CDR3 SEQ ID NO 5; и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность VL-CDR1 SEQ ID NO 6, аминокислотную последовательность VL-CDR2 SEQ ID NO 7 и аминокислотную последовательность VL-CDR3 SEQ ID NO 8, и

содержит константную область тяжелой цепи подкласса IgG1 или его варианта, для лечения опухоли.

ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ

к ответу на уведомление от 02.06.2023

3. Применение антитела, где антитело способно связываться с TIGIT человека и содержит:

(a) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность VH-CDR1 SEQ ID NO 3, аминокислотную последовательность VH-CDR2 SEQ ID NO 4 и аминокислотную последовательность VH-CDR3 SEQ ID NO 5; и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность VL-CDR1 SEQ ID NO 6, аминокислотную последовательность VL-CDR2 SEQ ID NO 7 и аминокислотную последовательность VL-CDR3 SEQ ID NO 8; или

(b) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность VH-CDR1 SEQ ID NO 3, аминокислотную последовательность VH-CDR2 SEQ ID NO 13 и аминокислотную последовательность VH-CDR3 SEQ ID NO 5; и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность VL-CDR1 SEQ ID NO 6, аминокислотную последовательность VL-CDR2 SEQ ID NO 7 и аминокислотную последовательность VL-CDR3 SEQ ID NO 8, и

содержит константную область тяжелой цепи подкласса IgG1 или его варианта, для лечения инфекционного заболевания.

4. Применение антитела, где антитело способно связываться с TIGIT человека и содержит:

(a) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность VH-CDR1 SEQ ID NO 3, аминокислотную последовательность VH-CDR2 SEQ ID NO 4 и аминокислотную последовательность VH-CDR3 SEQ ID NO 5; и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность VL-CDR1 SEQ ID NO 6, аминокислотную последовательность VL-CDR2 SEQ ID NO 7 и аминокислотную последовательность VL-CDR3 SEQ ID NO 8; или

(b) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность VH-CDR1 SEQ ID NO 3, аминокислотную последовательность VH-CDR2 SEQ ID NO 13 и аминокислотную последовательность VH-CDR3 SEQ ID NO 5; и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность VL-CDR1 SEQ ID NO 6, аминокислотную последовательность VL-CDR2 SEQ ID NO 7 и аминокислотную последовательность VL-CDR3 SEQ ID NO 8, и

содержит константную область тяжелой цепи подкласса IgG1 или его варианта, для стимуляции иммунного ответа у субъекта.

5. Применение по любому из пп. 1-4, где антитело представляет собой молекулу гуманизированного антитела.

6. Применение по любому из пп. 1-4, где антитело содержит переменный

домен тяжелой цепи, имеющий по меньшей мере 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 9, 14, или 19.

7. Применение по любому из пп. 1-4, где антитело содержит переменный домен легкой цепи, имеющий по меньшей мере 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 11, 16 или 21.

8. Применение по любому из пп. 1-4, где антитело содержит:

(a) переменный домен тяжелой цепи, имеющий по меньшей мере 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 9, и переменный домен легкой цепи, имеющий по меньшей мере 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 11;

(b) переменный домен тяжелой цепи, имеющий по меньшей мере 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 9, и переменный домен легкой цепи, имеющий по меньшей мере 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 16;

(c) переменный домен тяжелой цепи, имеющий по меньшей мере 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 9, и переменный домен легкой цепи, имеющий по меньшей мере 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 21;

(d) переменный домен тяжелой цепи, имеющий по меньшей мере 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 14, и переменный домен легкой цепи, имеющий по меньшей мере 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 11;

(e) переменный домен тяжелой цепи, имеющий по меньшей мере 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 14, и переменный домен легкой цепи, имеющий по меньшей мере 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 16;

(f) переменный домен тяжелой цепи, имеющий по меньшей мере 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичность последовательности с аминокислотной

последовательностью SEQ ID NO 14, и варибельный домен легкой цепи, имеющий по меньшей мере 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 21;

(g) варибельный домен тяжелой цепи, имеющий по меньшей мере 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 19, и варибельный домен легкой цепи, имеющий по меньшей мере 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 11;

(h) варибельный домен тяжелой цепи, имеющий по меньшей мере 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 19, и варибельный домен легкой цепи, имеющий по меньшей мере 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 16; или

(i) варибельный домен тяжелой цепи, имеющий по меньшей мере 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 19, и варибельный домен легкой цепи, имеющий по меньшей мере 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 21.

9. Применение по любому из пп. 1-4, где антитело содержит:

(a) варибельный домен тяжелой цепи, имеющий по меньшей мере 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 9, и варибельный домен легкой цепи, имеющий по меньшей мере 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 11;

(b) варибельный домен тяжелой цепи, имеющий по меньшей мере 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 14, и варибельный домен легкой цепи, имеющий по меньшей мере 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 16; или

(c) варибельный домен тяжелой цепи, имеющий по меньшей мере 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 19, и варибельный домен легкой цепи, имеющий по меньшей мере 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 21.

10. Применение по любому из пп. 1-4, где антитело содержит:

(a) переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO 9, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO 11;

(b) переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO 14, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO 16; или

(c) переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO 19, и переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO 21.

11. Применение по любому из пп. 1-10, где антитело содержит одну или более из:

(a) тяжелой цепи с мутацией T в A в положении 24 SEQ ID NO 14;

(b) тяжелой цепи с мутацией I в V в положении 37 SEQ ID NO 14;

(c) легкой цепи с мутацией V в I в положении 58 SEQ ID NO 16.

12. Применение по любому из пп. 1-4, где антитело содержит константную область тяжелой цепи с SEQ ID NO 18.

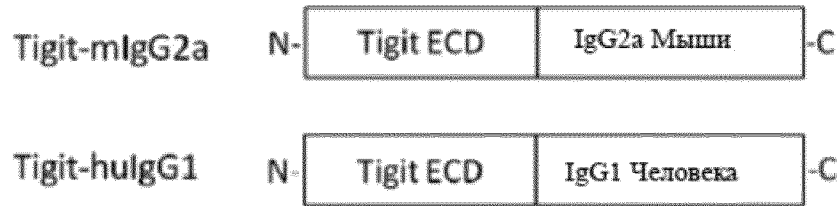
13. Применение по любому из пп. 1-4, где антитело содержит константную область легкой цепи типа каппа или лямбда или их варианта.

14. Применение по любому из пп. 1-4, где антитело способно активировать T-клетки.

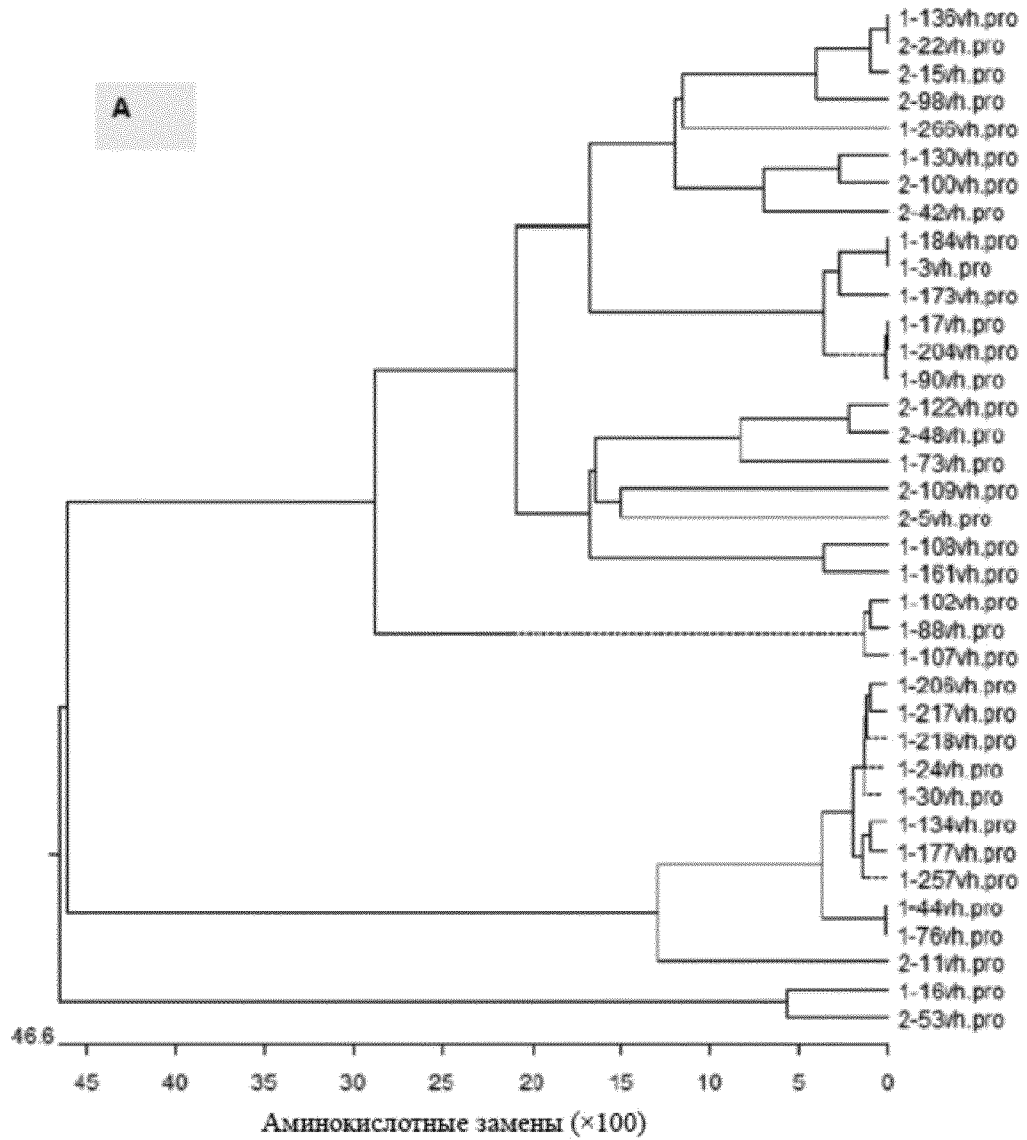
15. Применение по любому из пп. 1-4, где антитело способно усиливать цитотоксичность, опосредованную НК-клетками.

16. Применение по любому из пп. 1-4, где антитело способно снижать поверхностную экспрессию рецептора TIGIT.

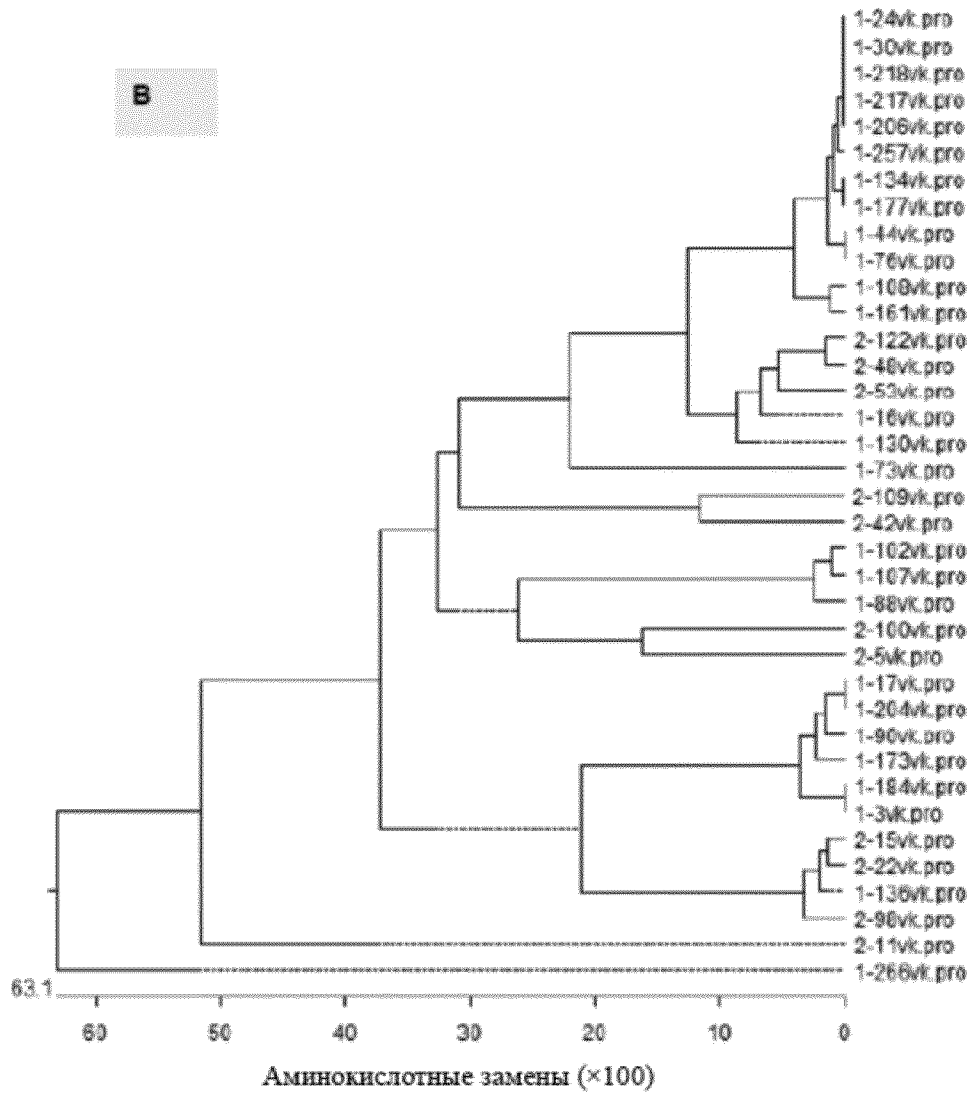
17. Применение по любому из пп. 1-4, где антитело способно индуцировать эффекторные функции ADCC (антителозависимая клеточная цитотоксичность) и/или CDC (комплемент-зависимая цитотоксичность).



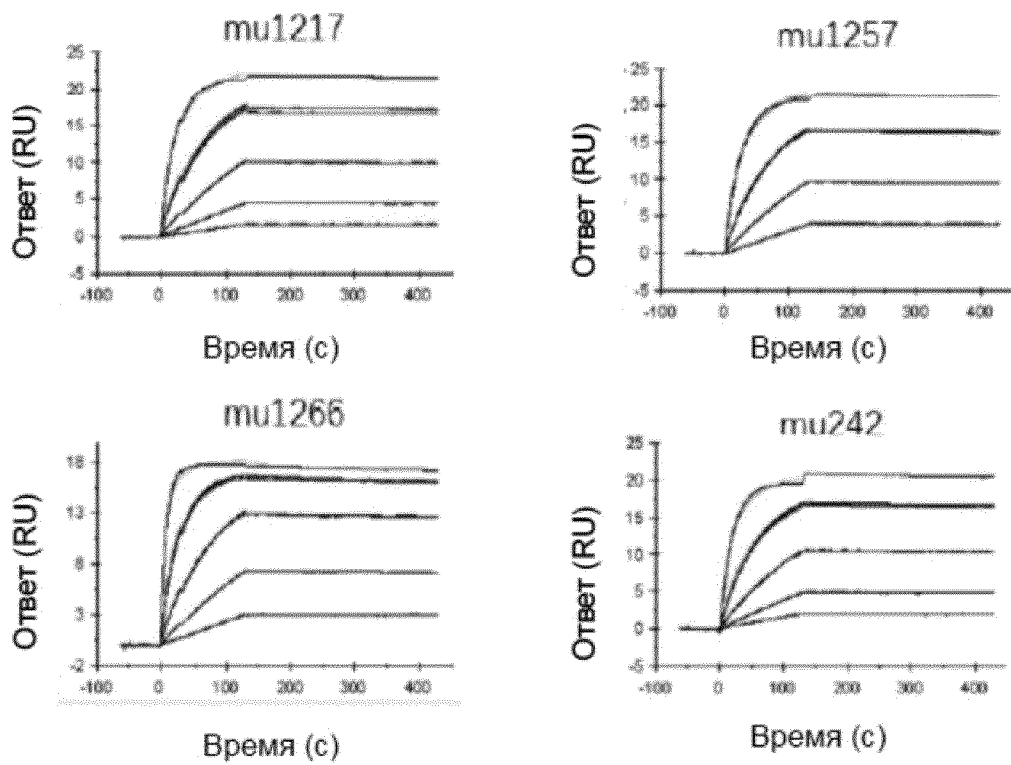
Фиг. 1



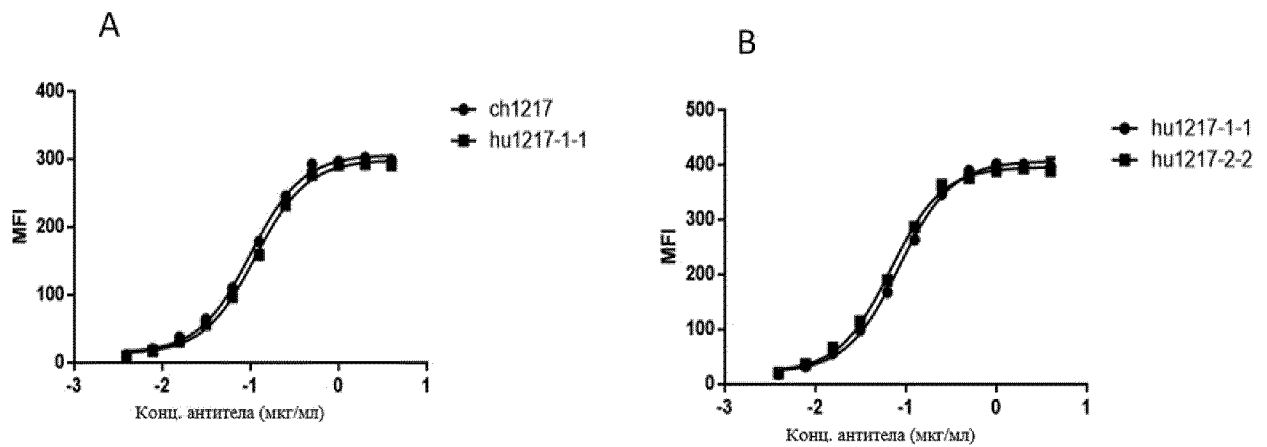
Фиг. 2



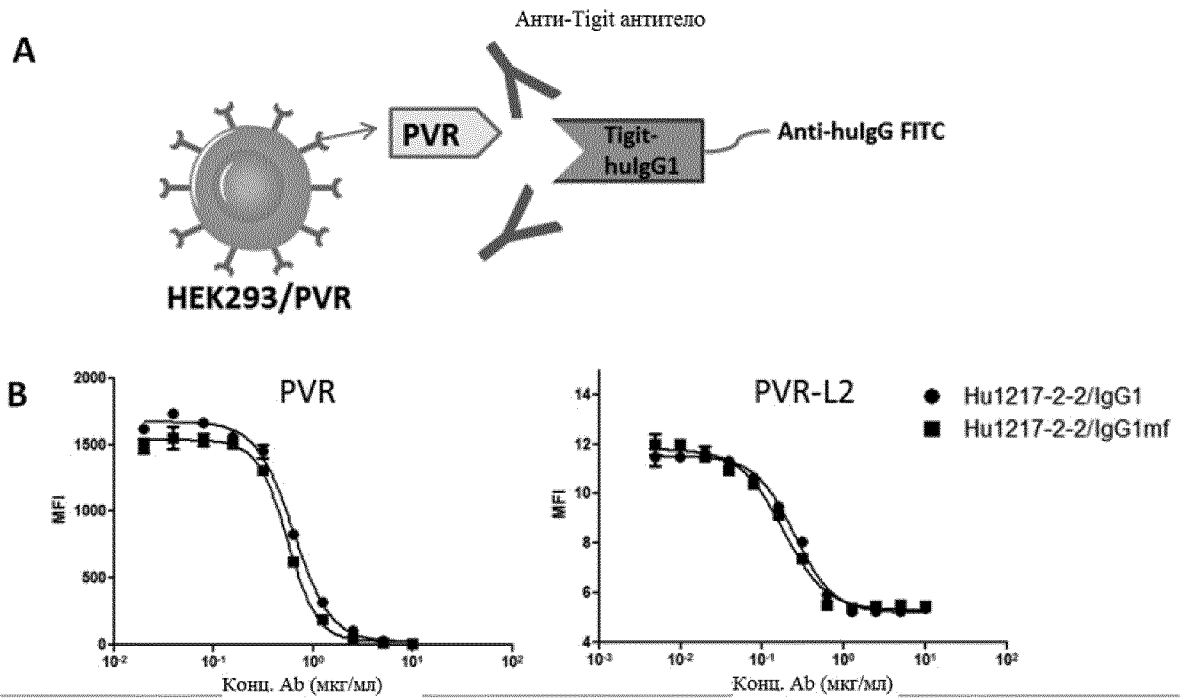
Фиг. 2



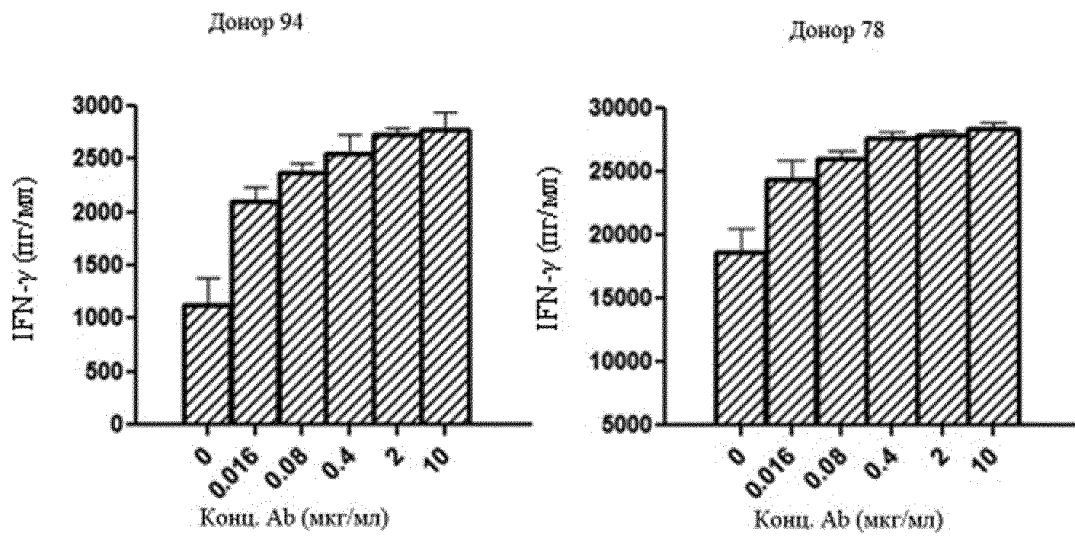
Фиг. 3



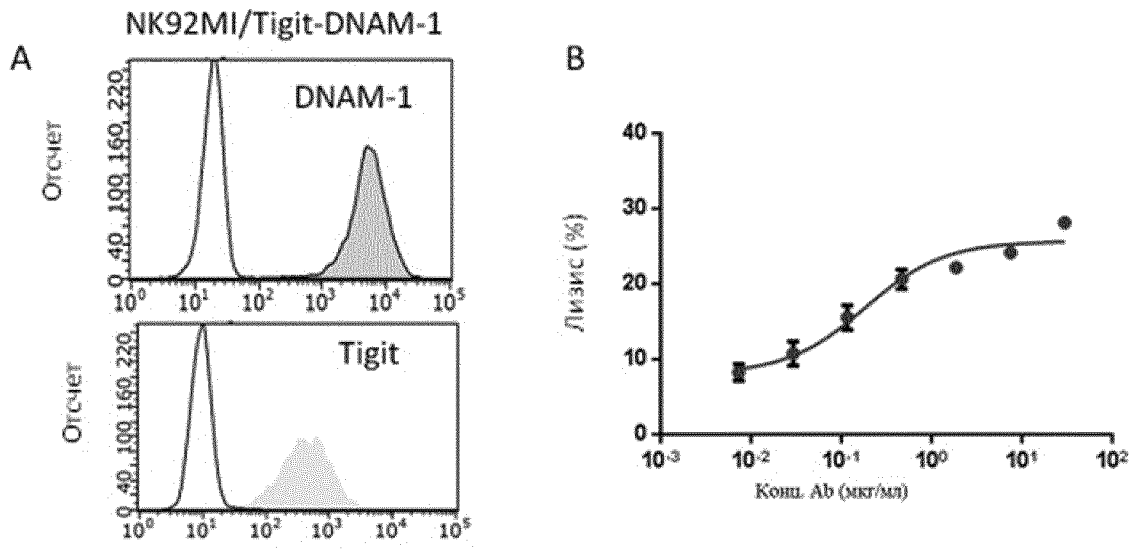
Фиг. 4



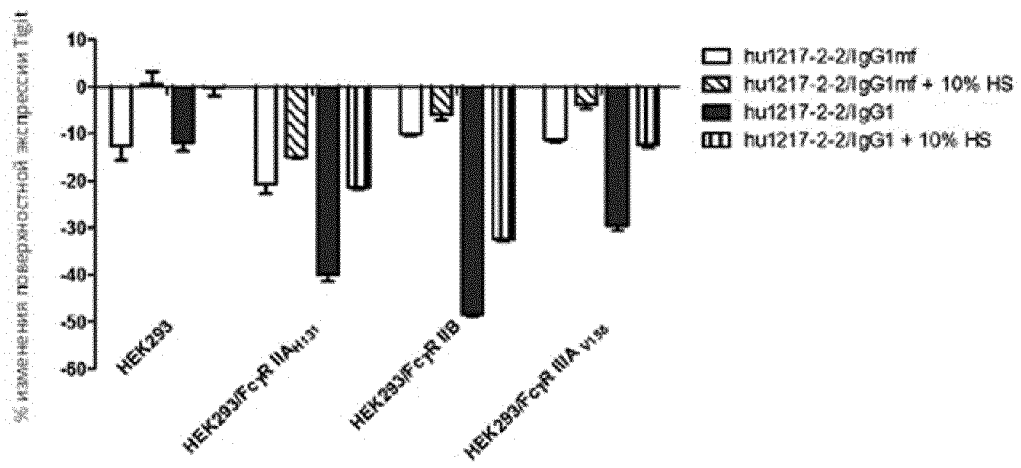
Фиг. 5



Фиг. 6

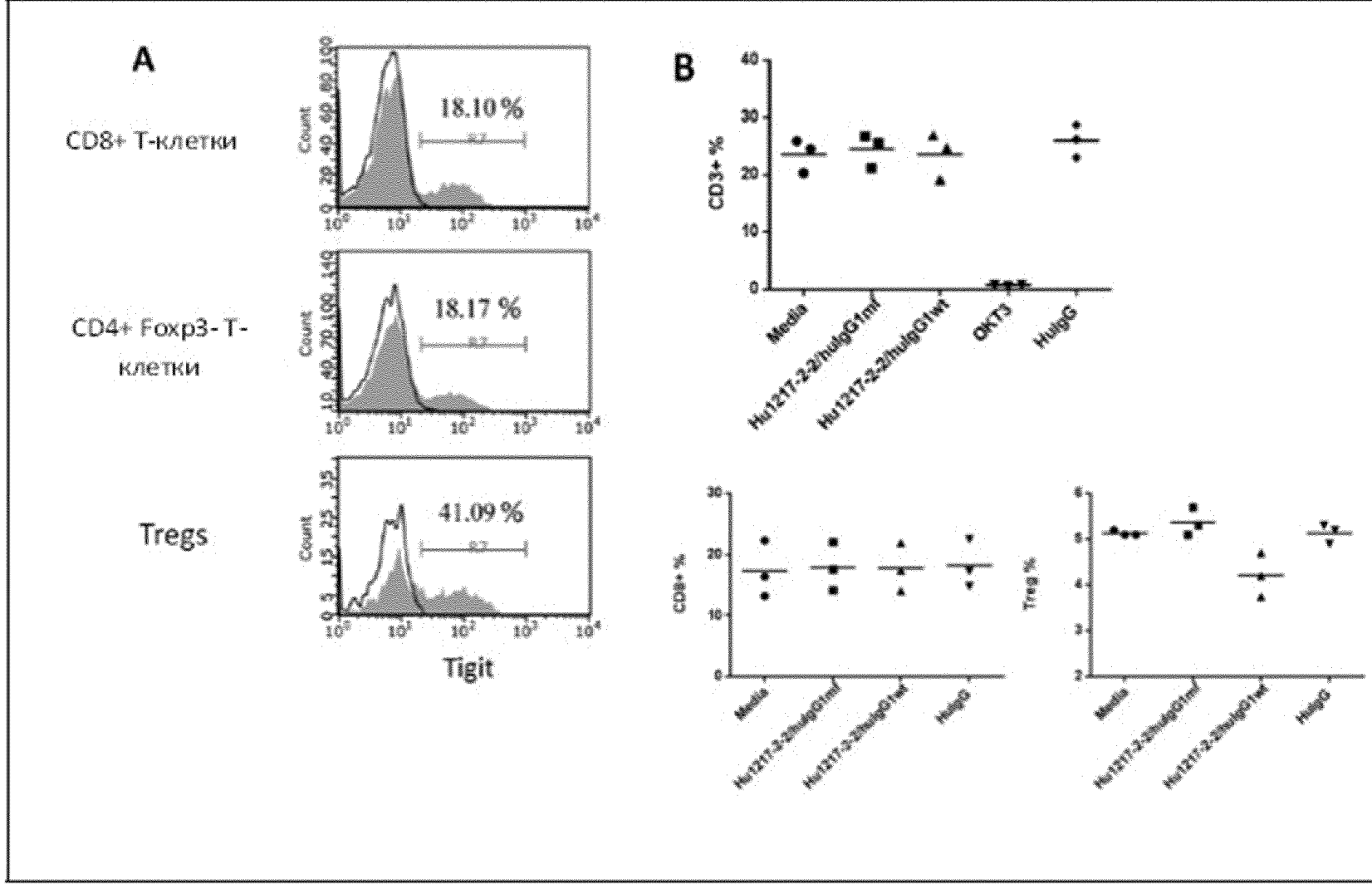


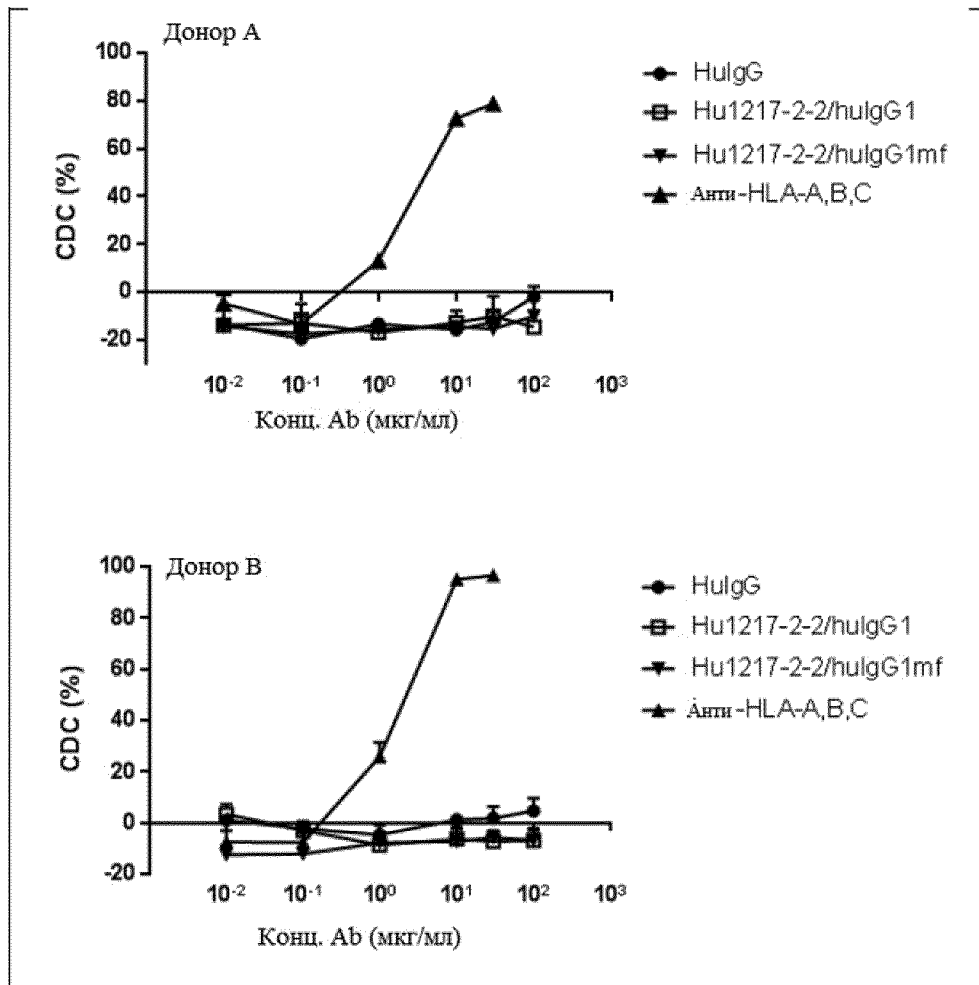
Фиг. 7



Фиг. 8

Фиг. 9





Фиг. 10

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference	FOR FURTHER ACTION	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. PCT/CN2018/125375	International filing date (<i>day/month/year</i>) 29 December 2018	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 30 December 2017
Applicant BeiGene, Ltd. et al		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 8 sheets.

It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

the international application in the language in which it was filed.

a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).

b. This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. **Certain claims were found unsearchable** (see Box No. II).

3. **Unity of invention is lacking** (see Box No. III).

4. With regard to the **title**,

the text is approved as submitted by the applicant.

the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

the text is approved as submitted by the applicant.

the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the **drawings**,

a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____

as suggested by the applicant.

as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.

as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

b. none of the figures is to be published with the abstract.

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: **14-18**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
 - [1] The subject matter of claims 14-18 relates to methods of treating disease in a subject, and therefore does not warrant an international search according to the criteria set out in Rule 39.1(iv). However, The search has been carried out and based on the use of the antibodies for manufacturing medicament.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. IV Text of the abstract (Continuation of item 5 of the first sheet)

Provided are antibodies that specifically bind to TIGIT (T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains, WUCAM or Vstm3) and inhibit Tigit-mediated cellular signaling and activities in immune cells. The anti- TIGIT antibodies can be used to treat or diagnose cancer, infectious diseases or other pathological disorders that may be modulated by Tigit-mediated functions.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/125375

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
A61K 39/395(2006.01)i; C07K 14/47(2006.01)i; C07K 16/28(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K39; C07K14		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) VEN,CNABS,CNTXT,EPTXT,USTXT,WOTXT,CNKI,WANFANG,EBI,NCBI,UNIPROT,GOOGLE SCHOLAR:tigit, immunoglobulin,antibod+, WUCAM ,Vstm3,HAVCR, CDR,affinit+, BEIGENE, SEQ ID NO:3-8, SEQ ID NO:9,11,14,16,19,21		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2016106302 A1 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY) 30 June 2017 (2017-06-30) the abstract, description, paragraphs 6-34	1-19
A	WO 2017030823 A2 (MERCK SHARP & DOHME) 23 February 2017 (2017-02-23) the abstract, description page 2, the last paragraph to page 11, the first paragraph	1-19
A	WO 2016011264 A1 (GENENTECH INC. ET AL.) 21 January 2016 (2016-01-21) description page 7, the first paragraph to page 9, paragraph 6	1-19
A	WO 2016028656 A1 (MERCK SHARP & DOHME ET AL.) 25 February 2016 (2016-02-25) the abstract, description page 2, the last paragraph to page 21, paragraph 2	1-19
A	WO 2015009856 A2 (GENENTECH INC. ET AL.) 22 January 2015 (2015-01-22) description paragraphs 46-53	1-19
A	WO 2016081746 A2 (SQUIBB BRISTOL MYERS CO.) 26 May 2016 (2016-05-26) the abstract, description page 2, the first paragraph to page 9, the last paragraph	1-19
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 13 March 2019		Date of mailing of the international search report 29 March 2019
Name and mailing address of the ISA/CN National Intellectual Property Administration, PRC 6, Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing 100088 China		Authorized officer LI,En
Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No. 86-(10)-53961874

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/125375

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2016106302	A1	22 June 2017	JP	2017520512	A	27 July 2017
				BR	112017013385	A2	06 February 2018
				SG	11201705063V	A	28 July 2017
				CA	2971732	A1	30 June 2016
				EP	3237448	A1	01 November 2017
				US	10189902	B2	29 January 2019
				MX	2017007744	A	05 September 2017
				US	2016176963	A1	23 June 2016
				TN	2017000267	A1	19 October 2018
				CN	107207594	A	26 September 2017
				PH	12017501166	A1	11 December 2017
				CL	2017001660	A1	23 March 2018
				UY	36471	A	30 June 2016
				JP	2018035138	A	08 March 2018
				WO	2016106302	A1	30 June 2016
				AR	103268	A1	26 April 2017
				KR	20170099966	A	01 September 2017
				IL	253013	D0	31 August 2017
				EA	201791171	A1	30 November 2017
				JP	6180663	B2	16 August 2017
PE	12442017	A1	24 August 2017				
CO	2017006989	A2	05 January 2018				
TW	201629102	A	16 August 2016				
AU	2015369683	A1	10 August 2017				
WO	2017030823	A2	23 February 2017	CN	108290936	A	17 July 2018
				CA	2994555	A1	23 February 2017
				AU	2016307845	A1	08 March 2018
				US	2018371083	A1	27 December 2018
				EP	3334757	A2	20 June 2018
				JP	2018527919	A	27 September 2018
				WO	2017030823	A3	30 March 2017
WO	2016011264	A1	21 January 2016	KR	20170023081	A	02 March 2017
				AU	2015289621	A1	12 January 2017
				SG	11201700258V	A	27 February 2017
				US	2017143825	A1	25 May 2017
				MX	2016017288	A	27 June 2017
				PE	01402017	A1	30 March 2017
				CL	2017000080	A1	23 June 2017
				BR	112017000703	A2	14 November 2017
				CN	107073108	A	18 August 2017
				JP	2017522311	A	10 August 2017
				EP	3169363	A1	24 May 2017
				CA	2953245	A1	21 January 2016
				PH	12017500070	A1	15 May 2017
				EA	201790195	A1	29 September 2017
				US	2018169239	A1	21 June 2018
				CR	20170014	A	17 October 2017
EP	3169363	A4	21 February 2018				
WO	2016028656	A1	25 February 2016	AU	2015305754	B2	25 October 2018
				TN	2017000024	A1	04 July 2018

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/125375

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		CR 20170060 A	18 April 2017
		PE 02892017 A1	05 April 2017
		CA 2957722 A1	25 February 2016
		CL 2017000310 A1	18 August 2017
		DO P2017000046 A	31 August 2017
		AP 201709765 A0	28 February 2017
		CN 107148430 A	08 September 2017
		US 2016355589 A1	08 December 2016
		AU 2015305754 A1	23 February 2017
		US 2017198042 A1	13 July 2017
		MD 20170032 A2	31 August 2017
		EA 201790413 A1	31 August 2017
		SG 11201701161Q A	30 March 2017
		IL 250583 D0	30 April 2017
		AP 201709765 D0	28 February 2017
		TW 201609813 A	16 March 2016
		PH 12017500296 A1	28 June 2017
		MX 2017002229 A	09 May 2017
		AU 2019200426 A1	07 February 2019
		KR 20170041272 A	14 April 2017
		JP 2017532007 A	02 November 2017
		BR 112017003108 A2	05 December 2017
		EP 3183267 A1	28 June 2017
		US 2018066055 A1	08 March 2018
WO 2015009856 A2	22 January 2015	KR 20160030936 A	21 March 2016
		US 2015216970 A1	06 August 2015
		AU 2014290069 B2	03 January 2019
		CN 105492025 A	13 April 2016
		HK 1217283 A1	06 January 2017
		EP 3021869 A2	25 May 2016
		TW 201545757 A	16 December 2015
		JP 2016525117 A	22 August 2016
		US 2017044256 A1	16 February 2017
		AU 2014290069 A1	11 February 2016
		IL 243324 D0	31 March 2016
		CA 2916681 A1	22 January 2015
		WO 2015009856 A3	16 April 2015
		RU 2016104880 A	21 August 2017
		US 2017037127 A1	09 February 2017
		MX 2016000510 A	07 April 2016
		BR 112016000853 A2	12 December 2017
		US 9873740 B2	23 January 2018
		RU 2016104880 A3	03 July 2018
		SG 11201600310Q A	26 February 2016
WO 2016081746 A2	26 May 2016	MX 2017006323 A	21 August 2017
		US 2018333502 A1	22 November 2018
		JP 2018501208 A	18 January 2018
		EA 201791127 A1	30 November 2017
		WO 2016081746 A3	18 August 2016
		CA 2968382 A1	26 May 2016

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/125375

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		EP 3221346 A2	27 September 2017
		BR 112017010094 A2	06 February 2018
		CN 107250157 A	13 October 2017
		WO 2016081746 A8	29 June 2017
<hr/>			