

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202391008 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.07.18(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2021.10.26

(54) АНТИТЕЛО К TIGIT И ЕГО ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ И ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 202011153458.2

(72) Изобретатель:

(32) 2020.10.26

Ли Байюн, Ся Юй, Ван Чжунминь,
Чжан Пэн (CN)

(33) CN

(86) PCT/CN2021/126277

(74) Представитель:

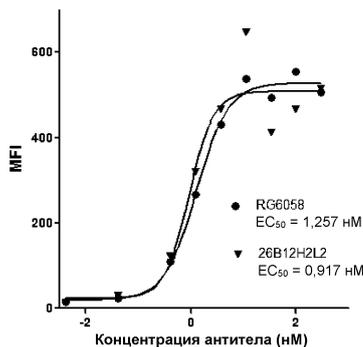
(87) WO 2022/089392 2022.05.05

Билык А.В., Поликарпов А.В.,
Соколова М.В., Путинцев А.И.,
Черкас Д.А., Игнатъев А.В., Дмитриев
А.В., Бучака С.М., Бельтюкова М.В.
(RU)

(71) Заявитель:

АКЕСО БИОФАРМА, ИНК. (CN)

(57) Антитело к TIGIT и его фармацевтическая композиция и применение. Настоящее изобретение относится к антителу к TIGIT или его антигенсвязывающему фрагменту, где переменная область тяжелой цепи указанного антитела содержит HCDR1-HCDR3, имеющие аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 3-5, соответственно; и переменная область легкой цепи указанного антитела содержит LCDR1-LCDR3, имеющие аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 8-10, соответственно. Указанное антитело может эффективно связываться с TIGIT и имеет потенциал для применения в предупреждении и лечении опухолей.



A1

202391008

202391008

A1

PCT/CN2021/126277

МПК C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

АНТИТЕЛО К TIGIT И ЕГО ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ И ПРИМЕНЕНИЕ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение принадлежит к области фармацевтики и относится к антителу к TIGIT, его фармацевтической композиции и его применению. Более конкретно, настоящее изобретение относится к моноклональному антителу к TIGIT.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

TIGIT (Т-клеточный рецептор с доменами Ig (иммуноглобулиновый) и ITIM (иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий мотив), также известный как WUCAM, Vstm3 или VSIG9) является представителем семейства рецептора полиовируса (PVR)/нектина. TIGIT состоит из внеклеточного домена варибельной области иммуноглобулина (IgV), трансмембранного домена типа I и внутриклеточного домена с классическим ингибирующим мотивом иммунорецепторов на основе тирозина (ITIM) и концевым тирозиновым мотивом иммуноглобулинов (ITT). TIGIT экспрессируется на высоком уровне в лимфоцитах, в частности в эффекторных и регуляторных CD4⁺ Т-клетках, фолликулярных хелперных CD4⁺ Т-клетках и эффекторных CD8⁺ Т-клетках, а также в клетках-естественных киллерах (NK-клетках) (Yu X, Harden K, Gonzalez L C, et al. The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells[J]. *Nature immunology*, 2009, 10(1): 48).

CD155 (также известный как PVR, Necl5 или Tage4), CD112 (также известный как PVRL2/нектин 2) и CD113 (также известный как PVRL3) представляют собой лиганды, с которыми связывается TIGIT (Martinet L, Smyth M J. Balancing natural killer cell activation through paired receptors[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2015, 15(4): 243-254), и CD155 является высокоаффинным лигандом для TIGIT. В NK-клетках связывание TIGIT с лигандами CD155 и CD112 может ингибировать уничтожающее действие NK-клеток на клетки с высоким уровнем экспрессии TIGIT (Stanietsky N, Simic H, Arapovic J, et al. The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human

NK cell cytotoxicity[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106(42): 17858-17863). Сообщалось, что уничтожающее действие CD8⁺ Т-клеток может быть усилено при одновременном блокировании PD-1 (белок программируемой смерти 1) и TIGIT (Johnston R J, Comps-Agrar L, Hackney J, et al. The immunoreceptor TIGIT regulates antitumor and antiviral CD8⁺ T cell effector function[J]. *Cancer cell*, 2014, 26(6): 923-937). В недавних исследованиях было обнаружено, что ингибирующий рецептор TIGIT, в качестве иммунной контрольной точки NK-клеток, может вызывать истощение NK-клеток в процессе развития опухоли, и было доказано, что моноклональные антитела к TIGIT могут обращать вспять истощение NK-клеток и применяться для иммунотерапии различных опухолей, таких как немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, рак молочной железы, рак яичника, колоректальный рак, меланома, рак поджелудочной железы, опухоль шейки матки, множественная миелома, неходжкинская лимфома, В-лимфома и рак плазматических клеток (Zhang Q, Bi J, Zheng X, et al. Blockade of the checkpoint receptor TIGIT prevents NK cell exhaustion and elicits potent anti-tumor immunity[J]. *Nature immunology*, 2018, 19(7): 723-732).

Уровни экспрессии TIGIT и CD155 в раковых тканях пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой (HCC) повышаются по мере снижения степени канцерогенеза. Доли TIGIT⁺ CD4⁺ Т-клеток и TIGIT⁺ Трег-клеток в периферической крови пациентов снижались после хирургического лечения HCC. Повышение экспрессии TIGIT положительно коррелировало с уровнем AFP (альфа-фетопротеина). Эти результаты указывают на то, что ко-ингибирующий рецептор TIGIT может быть вовлечен в патогенез HCC и представляет новую мишень для диагностики и лечения HCC (Duan Xiangguo, Liu Juanxi, Cui Jianjian et al. Expression of TIGIT/CD155 and correlations with clinical pathological features in human hepatocellular carcinoma[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20: 3773-3781).

Кроме того, сообщалось, что блокаторы TIGIT отдельно или в комбинации с блокаторами PD-1 плюс блокаторы CD96 значительно замедляли рост меланомы B16 в моделях на мышах дикого типа и мышах CD155^{-/-} (Li X-Y, Das I, Lepletier A, et al. CD155 loss enhances tumor suppression via combined host and tumor-intrinsic mechanisms. *J Clin Invest*, 2018, 128: 2613-25). Блокатор CD112R отдельно или в комбинации с блокаторами TIGIT и/или блокаторами PD-1 увеличивал способность TIL (лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль), продуцировать цитокины при раке яичника, раке

эндометрия и опухоли легкого (Whelan S, Ophir E, Kotturi MF, et al. PVRIG and PVRL2 electrode Induced in Cancer and Inhibit CD8⁺ T-cell function. *Cancer Immunol Res*, 2019, 7: 257-68).

Лекарственные средства на основе антител к TIGIT в качестве новых лекарственных средств на основе антител, нацеленных на иммунную контрольную точку, имеют перспективу применения в различных областях и могут применяться для иммунотерапии опухолей. Тираголумаб, разработанный компанией Roche, в настоящее время проходит фазу 3 клинических испытаний, и сообщалось, что комбинация моноклонального антитела к TIGIT тираголумаба и нацеленного на PD-L1 (лиганд PD-1) лекарственного средства Тецентрика (атезолизумаба) в качестве терапии первой линии хорошо переносилась пациентами с PD-L1-положительным метастатическим немелкоклеточным раком легкого (NSCLC) в фазе 2 клинических испытаний и оказывала значительный эффект – снижение риска прогрессирования заболевания на 43% (Exit C. Roche to present first clinical data on novel anti-TIGIT cancer immunotherapy tiragolumab at ASCO[J]).

Однако аффинность существующих лекарственных средств на основе антител к TIGIT человека является низкой; и все еще существует потребность в антителах к TIGIT с высокой аффинностью.

Таким образом, разработка лекарственных средств на основе антител с высокой аффинностью в отношении TIGIT, более высокой эффективностью и меньшим количеством токсических побочных эффектов для лечения аутоиммунных заболеваний имеет большое значение.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ

После интенсивных исследований и приложения творческих усилий авторы настоящего изобретения использовали системы экспрессии в клетках млекопитающих для экспрессии рекомбинантного TIGIT человека в качестве антигена для иммунизации мышей и получили клетки гибридомы путем слияния клеток селезенки мыши и клеток миеломы. Авторы настоящего изобретения получили линию клеток гибридомы LT019 (депонированную в ССТСС (Китайском центре коллекции типовых культур) под номером ССТСС С2020208) путем скрининга большого количества образцов.

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что линия клеток гибридомы LT019 может секретировать специфическое моноклональное антитело

(обозначенное как 26B12), специфично связывающееся с TIGIT человека, и указанное моноклональное антитело может эффективно связываться с TIGIT, уменьшать ингибирующее действие TIGIT на иммунные клетки, стимулировать активность Т-клеток, обращать вспять истощение НК-клеток и усиливать уничтожающее действие иммунных клеток на опухоль. Кроме того, авторы настоящего изобретения получили созданные ими гуманизированные антитела к TIGIT человека (обозначенные как 26B12H1L1, 26B12H4L1, 26B12H2L2, 26B12H3L2, 26B12H2L3, 26B12H3L3, 26B12H1L4 и 26B12H4L4).

Авторы настоящего изобретения также неожиданно обнаружили, что антитела 26B12H1L1, 26B12H4L1, 26B12H2L2, 26B12H3L2, 26B12H2L3, 26B12H3L3, 26B12H1L4 и 26B12H4L4 согласно настоящему изобретению обладают активностью связывания с TIGIT и высокой аффинностью; 26B12H1L1, 26B12H4L1, 26B12H2L2, 26B12H3L2, 26B12H2L3, 26B12H3L3, 26B12H1L4 и 26B12H4L4 могут эффективно снижать активность TIGIT. Антитела согласно настоящему изобретению имеют потенциал для лечения и/или предупреждения заболеваний, таких как опухоли (например, рак печени, рак почки, опухоль головного мозга, уротелиальная карцинома, опухоль кости, холангиокарцинома, немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, рак молочной железы, рак яичника, колоректальный рак, меланома, рак поджелудочной железы, опухоль шейки матки, множественная миелома, лимфома Ходжкина, неходжкинская лимфома, В-лимфома, рак яичника, рак плазматических клеток, рак эндометрия, рак предстательной железы и рак яичка). Настоящее изобретение подробно описано ниже.

Один аспект настоящего изобретения относится к антителу к TIGIT или его антигенсвязывающему фрагменту, где

вариабельная область тяжелой цепи указанного антитела содержит HCDR1(область, определяющая комплементарность, тяжелой цепи 1)-HCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO: 3-5, соответственно, и вариабельная область легкой цепи указанного антитела содержит LCDR1(область, определяющая комплементарность, легкой цепи 1)-LCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO: 8-10, соответственно.

В одном или более воплощениях настоящего изобретения предложены антитело

к TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент, где переменная область тяжелой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 17; и

переменная область легкой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 25.

В одном или более воплощениях настоящего изобретения предложены антитела к TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент, где

переменная область тяжелой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, и переменная область легкой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6;

переменная область тяжелой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, и переменная область легкой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19;

переменная область тяжелой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17, и переменная область легкой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19;

переменная область тяжелой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, и переменная область легкой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21;

переменная область тяжелой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, и переменная область легкой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23;

переменная область тяжелой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15, и переменная область легкой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21;

вариабельная область тяжелой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15, и вариабельная область легкой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23;

вариабельная область тяжелой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, и вариабельная область легкой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25; или

вариабельная область тяжелой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17, и вариабельная область легкой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25.

В одном или более воплощениях настоящего изобретения предложены антитело к TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент, где указанное антитело содержит отличную от CDR (область, определяющая комплементарность) область, имеющую происхождение из вида, отличного от мышинных, например антитела человека.

В одном или более воплощениях настоящего изобретения предложены антитело к TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент, где константная область тяжелой цепи указанного антитела представляет собой С-область цепи гамма-1 Ig (например, под номером доступа в базе данных NCBI: P01857) или С-область цепи гамма-4 Ig (например, под номером доступа в базе данных NCBI: P01861.1); константная область легкой цепи указанного антитела представляет собой С-область цепи каппа Ig (например, под номером доступа в базе данных NCBI: P01834).

В одном или более воплощениях настоящего изобретения предложены антитело к TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент, где указанные антитело к TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb, фрагмента области, определяющей комплементарность, одноцепочечного антитела, гуманизированного антитела, химерного антитела и диатела.

В одном или более воплощениях настоящего изобретения предложены антитело к TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент, где указанное антитело связывается с TIGIT-mFc с K_D, составляющей менее 4E-10 или менее 4E-11; предпочтительно K_D определяют с помощью прибора для анализа молекулярных взаимодействий от

компании Fortebio.

В одном или более воплощениях настоящего изобретения предложены антитело к TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент, где указанное антитело связывается с TIGIT-mFc с EC_{50} , составляющей менее 1,5 нМ, менее 1,2 нМ или менее 1 нМ; предпочтительно EC_{50} определяют с помощью проточного цитометра.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения антитело к TIGIT представляет собой моноклональное антитело.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения антитело к TIGIT представляет собой гуманизированное антитело, химерное антитело или мультиспецифическое антитело (например, биспецифическое антитело).

В некоторых воплощениях настоящего изобретения антигенсвязывающий фрагмент выбран из Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb, Fab/c, фрагмента области, определяющей комплементарность, одноцепочечного антитела (например, scFv), гуманизированного антитела, химерного антитела и биспецифического антитела.

В одном или более воплощениях настоящего изобретения предложены антитело к TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент, где указанное антитело представляет собой антитело, продуцируемое линией клеток гибридомы LT019, депонированной в Китайском центре коллекции типовых культур (ССТСС) под номером ССТСС С2020208.

Другой аспект настоящего изобретения относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей любые из антител к TIGIT или их антигенсвязывающих фрагментов в соответствии с настоящим изобретением.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к вектору, содержащему выделенную молекулу нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к клетке-хозяину, содержащей выделенную молекулу нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению или вектор согласно настоящему изобретению.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к линии клеток гибридомы LT019, депонированной в Китайском центре коллекции типовых культур (ССТСС) под номером ССТСС С2020208.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к конъюгату, содержащему антитело и конъюгированную группировку, где антитело представляет собой любые из

антител к TIGIT или их антигенсвязывающих фрагментов в соответствии с настоящим изобретением, и конъюгированная группировка представляет собой детектируемую метку; предпочтительно конъюгированная группировка представляет собой радиоизотоп, флуоресцентное вещество, люминесцентное вещество, окрашенное вещество или фермент.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к набору, содержащему любые из антител к TIGIT или их антигенсвязывающих фрагментов в соответствии с настоящим изобретением или содержащему конъюгат в соответствии с настоящим изобретением;

предпочтительно указанный набор дополнительно содержит вторичное антитело, специфично распознающее указанное антитело; возможно, вторичное антитело дополнительно содержит детектируемую метку, например радиоизотоп, флуоресцентное вещество, люминесцентное вещество, окрашенное вещество или фермент.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к применению любого из антител в соответствии с настоящим изобретением или конъюгата в соответствии с настоящим изобретением в получении набора для определения присутствия или уровня TIGIT в образце.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей любые из антител к TIGIT или их антигенсвязывающих фрагментов в соответствии с настоящим изобретением или конъюгат в соответствии с настоящим изобретением; возможно, фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель и/или эксципиент.

В одном или более воплощениях настоящего изобретения фармацевтическая композиция дополнительно содержит одно или более антител к PD-1 или одно или более антител к PD-L1.

В одном или более воплощениях настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, где массовое отношение антитела к TIGIT или его антигенсвязывающего фрагмента к антителу к PD-1 или антителу к PD-L1 составляет (1:5)-(5:1), например 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 или 5:1, из расчета на массу антител.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к биспецифическому

антителу, содержащему первую функциональную область белка и вторую функциональную область белка, где:

первая функциональная область белка нацелена на TIGIT;

вторая функциональная область белка нацелена на отличную от TIGIT мишень (например, PD-1);

при этом первая функциональная область белка представляет собой любые из антител или антигенсвязывающих фрагментов в соответствии с настоящим изобретением;

предпочтительно биспецифическое антитело имеет формат IgG-scFv;

предпочтительно первая функциональная область белка представляет собой любое из антител в соответствии с настоящим изобретением и находится в форме иммуноглобулина, и вторая функциональная область белка представляет собой одноцепочечное антитело; или

предпочтительно первая функциональная область белка представляет собой одноцепочечное антитело, и вторая функциональная область белка представляет собой антитело в форме иммуноглобулина.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения предложено биспецифическое антитело, где любое из антител в соответствии с настоящим изобретением находится в форме иммуноглобулина.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения предложено биспецифическое антитело, где одноцепочечное антитело находится в форме «вариабельная область тяжелой цепи-линкерный фрагмент-вариабельная область легкой цепи».

В некоторых воплощениях настоящего изобретения предложено биспецифическое антитело, где первая функциональная область белка и вторая функциональная область белка связаны непосредственно или через линкерный фрагмент; этот линкерный фрагмент и вышеупомянутый линкерный фрагмент в одноцепочечном антителе могут быть идентичными или различаться и могут представлять собой линкерные фрагменты, обычно используемые в данной области техники.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения предложено биспецифическое антитело, где число каждой из первой функциональной области белка

и второй функциональной области белка независимо равно 1, 2 или больше.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения предложено биспецифическое антитело, где одноцепочечное антитело связано с С-концами двух тяжелых цепей антитела в форме иммуноглобулина; предпочтительно каждая тяжелая цепь связана с одноцепочечным антителом.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к комбинированному продукту, содержащему первый продукт и второй продукт в отдельных упаковках, где

первый продукт содержит любые из антител к TIGIT или их антигенсвязывающих фрагментов в соответствии с настоящим изобретением, конъюгат в соответствии с настоящим изобретением или любую из фармацевтических композиций в соответствии с настоящим изобретением;

второй продукт содержит по меньшей мере одно антитело к PD-1 или по меньшей мере одно антитело к PD-L1;

предпочтительно указанные первый продукт и второй продукт дополнительно независимо содержат один или более фармацевтически приемлемых адъювантов (например, носителей и/или эксципиентов);

предпочтительно комбинированный продукт дополнительно содержит листовку-вкладыш в упаковке.

В одном или более воплощениях настоящего изобретения предложен комбинированный продукт, где массовое отношение антитела к TIGIT или его антигенсвязывающего фрагмента к антителу к PD-1 или антителу к PD-L1 составляет (1:5)-(5:1), например 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 или 5:1, из расчета на массу антител.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к применению любого из антител или их антигенсвязывающих фрагментов в соответствии с настоящим изобретением, конъюгата в соответствии с настоящим изобретением, любого из биспецифических антител в соответствии с настоящим изобретением, любой из фармацевтических композиций в соответствии с настоящим изобретением или любого из комбинированных продуктов в соответствии с настоящим изобретением в получении лекарственного средства для лечения и/или предупреждения опухоли; предпочтительно опухоль выбрана из одного или более из рака печени, рака почки, опухоли головного мозга, уротелиальной карциномы, опухоли кости,

холангиокарциномы, немелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, рака молочной железы, рака яичника, колоректального рака, меланомы, рака поджелудочной железы, опухоли шейки матки, множественной миеломы, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, В-лимфомы, рака яичника, рака плазматических клеток, рака эндометрия, рака предстательной железы и рака яичка.

Любые из антител или их антигенсвязывающих фрагментов в соответствии с настоящим изобретением, конъюгат в соответствии с настоящим изобретением, любое из биспецифических антител в соответствии с настоящим изобретением, любая из фармацевтических композиций в соответствии с настоящим изобретением или любой из комбинированных продуктов в соответствии с настоящим изобретением предложены для применения в лечении и/или предупреждении опухоли; предпочтительно опухоль выбрана из одного или более из рака печени, рака почки, опухоли головного мозга, уротелиальной карциномы, опухоли кости, холангиокарциномы, немелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, рака молочной железы, рака яичника, колоректального рака, меланомы, рака поджелудочной железы, опухоли шейки матки, множественной миеломы, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, В-лимфомы, рака яичника, рака плазматических клеток, рака эндометрия, рака предстательной железы и рака яичка.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к способу лечения и/или предупреждения опухоли, включающему стадию введения нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества любого из антител или их антигенсвязывающих фрагментов в соответствии с настоящим изобретением, конъюгата в соответствии с настоящим изобретением, любого из биспецифических антител в соответствии с настоящим изобретением, любой из фармацевтических композиций в соответствии с настоящим изобретением или любого из комбинированных продуктов в соответствии с настоящим изобретением; предпочтительно опухоль выбрана из одного или более из рака печени, рака почки, опухоли головного мозга, уротелиальной карциномы, опухоли кости, холангиокарциномы, немелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, рака молочной железы, рака яичника, колоректального рака, меланомы, рака поджелудочной железы, опухоли шейки матки, множественной миеломы, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, В-лимфомы, рака яичника, рака плазматических клеток, рака эндометрия, рака предстательной железы и рака яичка.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения рак печени представляет собой гепатоцеллюлярную карциному.

Вариабельные области легкой цепи и тяжелой цепи определяют связывание антигена; вариабельная область каждой цепи содержит три гипервариабельные области, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR) (CDR тяжелой цепи (H) содержат HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и CDR легкой цепи (L) содержат LCDR1, LCDR2 и LCDR3, которые названы в источнике Kabat et al., см. Bethesda M.d., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, NIH Publication 1991; 1-3:91-3242).

Предпочтительно CDR также могут быть определены с использованием системы нумерации IMGT, см. Ehrenmann, Francois, Quentin Kaas, and Marie-Paule Lefranc. IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign: a database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MhcSF. *Nucleic acids research* 2009; 38(suppl_1): D301-D307.

Аминокислотные последовательности CDR последовательностей моноклональных антител подвергаются анализу в соответствии с определением IMGT с помощью технических средств, хорошо известных специалистам в данной области техники, например с использованием базы данных VBASE2.

Антитела 26B12, 26B12H1L1, 26B12H4L1, 26B12H2L2, 26B12H3L2, 26B12H2L3, 26B12H3L3, 26B12H1L4 и 26B12H4L4, вовлеченные в настоящее изобретение, содержат одни и те же CDR:

3 CDR вариабельных областей их тяжелых цепей имеют следующие аминокислотные последовательности:

HCDR1: GHSFTSDYA (SEQ ID NO: 3)

HCDR2: ISYSDST (SEQ ID NO: 4)

HCDR3: ARLDYGNYGGAMDY (SEQ ID NO: 5);

3 CDR вариабельных областей их легких цепей имеют следующие аминокислотные последовательности:

LCDR1: QHVSTA (SEQ ID NO: 8)

LCDR2: SAS (SEQ ID NO: 9)

LCDR3: QQHYITPWT (SEQ ID NO: 10).

В настоящем изобретении, если не указано иное, научные и технические

термины, используемые в настоящем документе, имеют значения, обычно понятные специалистам в данной области техники. Кроме того, используемые в настоящем изобретении лабораторные процессы, включающие культивирование клеток, молекулярную генетику, химию нуклеиновых кислот и иммунологию, являются рутинными процедурами, широко используемыми в соответствующих областях. Вместе с тем, для лучшего понимания настоящего изобретения ниже приведены определения и пояснения соответствующих терминов.

В настоящем документе при упоминании аминокислотной последовательности TIGIT (идентификационный номер в базе данных GenBank NCBI: NP_776160.2) она включает полноразмерный белок TIGIT или внеклеточный домен варибельной области иммуноглобулина (IgV) или фрагмент, содержащий внеклеточный домен варибельной области иммуноглобулина (IgV); также включены содержащие TIGIT слитые белки, такие как фрагмент, слитый с белковым Fc-фрагментом мышинового или человеческого IgG (mFc или hFc). Однако специалистам в данной области техники будет понятно, что в аминокислотной последовательности белка TIGIT мутации или вариации (включая, но без ограничения, замены, делеции и/или добавления) могут встречаться в природе или могут быть введены искусственно без влияния на биологические функции этого белка. Таким образом, в настоящем изобретении термин «белок TIGIT» или «TIGIT» должен включать все такие последовательности, включая приведенные последовательности и их природные или искусственные варианты. Более того, при описании фрагмента последовательности белка TIGIT включен не только фрагмент этой последовательности, но также и соответствующий фрагмент природных или искусственных вариантов этой последовательности.

В настоящем документе термин EC_{50} относится к концентрации, обеспечивающей 50% от максимального эффекта, то есть к концентрации, которая может вызывать 50% от максимального эффекта.

В настоящем документе термин «антитело» относится к молекуле иммуноглобулина, которая обычно состоит из двух пар полипептидных цепей (каждая пара с одной «легкой» (L) цепью и одной «тяжелой» (H) цепью). Легкие цепи антител классифицируют на легкие цепи κ и λ . Тяжелые цепи классифицируют на μ , δ , γ , α или ϵ . Изоотипы антител определяют как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE. В легких цепях и тяжелых цепях варибельная область и константная область соединены областью «J», состоящей

из приблизительно 12 или более аминокислот, и тяжелая цепь дополнительно содержит область «D», состоящую из приблизительно 3 или более аминокислот. Каждая тяжелая цепь состоит из варибельной области тяжелой цепи (V_H) и константной области тяжелой цепи (C_H). Константная область тяжелой цепи состоит из 3 доменов (C_{H1} , C_{H2} и C_{H3}). Каждая легкая цепь состоит из варибельной области легкой цепи (V_L) и константной области легкой цепи (C_L). Константная область легкой цепи состоит из одного домена C_L . Константная область антитела может опосредовать связывание иммуноглобулинов с тканями или факторами хозяина, включая связывание различных клеток иммунной системы (например, эффекторных клеток) с первым компонентом ($C1q$) классической системы комплемента. Области V_H и V_L могут быть дополнительно подразделены на гиперварибельные области (называемые областями, определяющими комплементарность, или CDR) и консервативные области, называемые каркасными областями (FR), которые распределены между CDR. Каждая V_H и V_L состоит из 3 CDR и 4 FR, расположенных от N-конца к C-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Варибельные области (V_H и V_L) каждой пары тяжелая цепь/легкая цепь образуют антигенсвязывающие сайты, соответственно. Отнесение аминокислот к областям или доменам основывается на источниках Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, M.d. (1987 и 1991)) или Chothia & Lesk *J. Mol. Biol.* 1987; 196:901-917; Chothia et al. *Nature* 1989; 342:878-883, либо на определении системы нумерации IMGT, см. указанное определение в источнике Ehrenmann, Francois, Quentin Kaas, and Marie-Paule Lefranc. "IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign: a database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MhcSF." *Nucleic acids research* 2009; 38(suppl_1): D301-D307. Термин «антитело» не ограничивается каким-либо конкретным способом получения антитела. Например, антитело включает, в частности, рекомбинантное антитело, моноклональное антитело и поликлональное антитело. Антитело может представлять собой антитела различных изоформ, таких как IgG (например, подтипы IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), IgA1, IgA2, IgD, IgE или IgM.

В настоящем документе термин «антигенсвязывающий фрагмент», также известный как «антигенсвязывающий участок», относится к полипептиду, содержащему фрагмент полноразмерного антитела, который сохраняет способность специфично связываться с тем же антигеном, с которым связывается полноразмерное

антитело, и/или конкурирует с полноразмерным антителом за специфическое связывание с антигеном. См., в целом, источник *Fundamental Immunology*, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd edition, Raven Press, N.Y. (1989)), который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки для всех целей. Антигенсвязывающий фрагмент антитела может быть получен с помощью технологии рекомбинантной ДНК или путем ферментативного или химического расщепления интактного антитела. В некоторых случаях антигенсвязывающий фрагмент содержит Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb и фрагменты области, определяющей комплементарность (CDR), одноцепочечные фрагменты антитела (например, scFv), химерные антитела, диатела и полипептиды, содержащие по меньшей мере часть антитела, достаточную для придания им специфической антигенсвязывающей способности.

В настоящем документе термин «Fd-фрагмент» относится к фрагменту антитела, состоящему из доменов V_H и C_{H1}; термин «Fv-фрагмент» относится к фрагменту антитела, состоящему из доменов V_L и V_H одного плеча антитела; термин «dAb-фрагмент» относится к фрагменту антитела, состоящему из домена V_H (Ward et al., *Nature* 341:544-546 (1989)); термин «Fab-фрагмент» относится к фрагменту антитела, состоящему из доменов V_L, V_H, C_L и C_{H1}; и термин «F(ab')₂-фрагмент» относится к фрагменту антитела, содержащему два Fab-фрагмента, связанных посредством дисульфидного мостика в шарнирной области.

В некоторых случаях антигенсвязывающий фрагмент антитела представляет собой одноцепочечное антитело (например, scFv), в котором домены V_L и V_H спарены с образованием моновалентной молекулы посредством линкера, который обеспечивает получение единой полипептидной цепи (см., например, Bird et al., *Science* 242:423-426 (1988) и Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988)). Такие молекулы scFv могут иметь общую структуру: NH₂-V_L-линкер-V_H-COOH или NH₂-V_H-линкер-V_L-COOH. Подходящий линкер, известный из предшествующего уровня техники, состоит из повторов аминокислотной последовательности GGGGS или ее варианта. Например, может быть использован линкер, имеющий аминокислотную последовательность (GGGGS)₄, но также могут быть использованы его варианты (Holliger et al. (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448). Другие линкеры, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, описаны в источниках Alfthan et al. (1995), *Protein Eng.* 8:725-731; Choi et al. (2001), *Eur. J. Immunol.* 31:

94-106; Hu et al. (1996), *Cancer Res.* 56:3055-3061; Kipriyanov et al. (1999), *J. Mol. Biol.* 293:41-56; и Roovers et al. (2001), *Cancer Immunol.*

В некоторых случаях антигенсвязывающий фрагмент антитела представляет собой диатело, то есть бивалентное антитело, в котором домены V_H и V_L экспрессируются на одной полипептидной цепи. Однако используемый линкер слишком короткий для того, чтобы допустить спаривание двух доменов на одной цепи, вследствие чего домены вынуждены спариваться с комплементарными доменами на другой цепи, и образуются два антигенсвязывающих сайта (см., например, Holliger P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993), и Poljak R. J. et al., *Structure* 2: 1121-1123 (1994)).

В других случаях антигенсвязывающий фрагмент антитела представляет собой «биспецифическое антитело», которое относится к конъюгату, образованному из первичного антитела (фрагмента) и вторичного антитела (фрагмента) или аналога антитела посредством линкера; способы конъюгации включают, но без ограничения, химическую реакцию, слияние генов и ферментативный катализ. Антигенсвязывающий фрагмент антитела может представлять собой «мультиспецифическое антитело», включая, например, триспецифическое антитело и тетраспецифическое антитело, при этом первое представляет собой антитело с тремя различными типами антигенсвязывающей специфичности, а второе представляет собой антитело с четырьмя различными типами антигенсвязывающей специфичности. Например, сконструированный белок на основе анкириновых повторов (DARPin) связан с антителом IgG, фрагментом антитела scFv-Fc или их комбинациями, такими как описанные в источнике CN104341529A. Финомер анти-IL-17a связывается с антителом к IL-6R, таким как описанное в WO2015141862A1.

Антигенсвязывающие фрагменты антител (например, фрагменты антител, описанные выше) могут быть получены из данного антитела (например, моноклонального антитела 26B12H1L1, 26B12H4L1, 26B12H2L2, 26B12H3L2, 26B12H2L3, 26B12H3L3, 26B12H1L4 или 26B12H4L4, предложенного в настоящем изобретении) с использованием обычных методик, известных специалистам в данной области техники (например, технологии рекомбинантной ДНК или ферментативного или химического расщепления), и антигенсвязывающие фрагменты антител подвергают такому же скринингу на специфичность, как и интактные антитела.

В настоящем документе термины «mAb» и «моноклональное антитело» относятся к антителу или фрагменту антитела, полученному из группы высокогомологичных антител, то есть из группы идентичных молекул антител, за исключением природных мутаций, которые могут возникать спонтанно. Моноклональное антитело обладает высокой специфичностью в отношении единственного эпитопа на антигене. Поликлональное антитело, по сравнению с моноклональным антителом, обычно содержит по меньшей мере 2 или более различных антител, которые, как правило, распознают разные эпитопы на антигене. Моноклональные антитела обычно могут быть получены с использованием гибридомной технологии, впервые описанной в источнике Kohler et al. (Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity [J]. *Nature*, 1975; 256(5517): 495), но также они могут быть получены с использованием технологии рекомбинантной ДНК (см., например, патент США № 4816567).

В настоящем документе термин «гуманизованное антитело» относится к антителу или фрагменту антитела, полученным путем замены всех или части CDR иммуноглобулина человека (антитела-реципиента) на CDR антитела из вида, отличного от человека (антитела-донора), где антитело-донор может представлять собой антитело из вида, отличного от человека (например, мыши, крысы или кролика), обладающее ожидаемой специфичностью, аффинностью или реактивностью. Кроме того, некоторые аминокислотные остатки в каркасных областях (FR) антитела-реципиента также могут быть заменены на аминокислотные остатки соответствующих антител из вида, отличного от человека, или аминокислотные остатки других антител для дополнительного улучшения или оптимизации характеристик антитела. Более подробные сведения о гуманизованных антителах см., например, в источниках Jones et al., *Nature* 1986; 321:522-525; Reichmann et al., *Nature* 1988; 332:323-329; Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1992; 2:593-596; и Clark M. Antibody humanization: a case of the 'Emperor's new clothes'? [J]. *Immunol. Today*, 2000; 21(8): 397-402.

В настоящем документе термин «выделенный» относится к получению искусственными способами из природного состояния. Если некоторые «выделенные» вещество или компонент присутствуют в природе, то это может быть случаем, когда изменение происходит в их природной среде, или когда их выделяют из природной среды, или и то, и другое. Например, некоторый не являющийся выделенным

полинуклеотид или полипептид встречается в природе у некоторого живого животного, и тот же самый полинуклеотид или полипептид, выделенный с высокой чистотой из такого природного состояния, называют выделенным полинуклеотидом или полипептидом. Термин «выделенный» не исключает присутствия искусственных или синтетических веществ или других примесей, не влияющих на активность вещества.

В настоящем документе термин «вектор» относится к переносчику нуклеиновой кислоты, в который может быть встроен полинуклеотид. Если вектор обеспечивает экспрессию белка, кодируемого встроенным полинуклеотидом, то такой вектор называют вектором экспрессии. Вектор может быть введен в клетку-хозяина путем трансформации, трансдукции или трансфекции таким образом, что элементы генетического вещества, переносимые вектором, могут быть экспрессированы в клетке-хозяине. Векторы хорошо известны специалистам в данной области техники и включают, но без ограничения: плазмиды; фагмиды; космиды; искусственные хромосомы, такие как искусственная дрожжевая хромосома (YAC), искусственная бактериальная хромосома (BAC) или полученная из P1 искусственная хромосома (PAC); фаги, такие как фаги лямбда или фаги M13; и вирусы животных. Вирусы животных, которые можно применять в качестве векторов, включают, но без ограничения, ретровирусы (включая лентивирусы), аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса (такие как вирус простого герпеса), поксвирусы, бакуловирусы, папилломавирусы и паповавирусы (такие как SV40). Вектор может содержать ряд элементов, которые управляют экспрессией, включая, но без ограничения, промоторные последовательности, последовательности инициации транскрипции, энхансерные последовательности, элементы для селекции и репортерные гены. Кроме того, вектор может дополнительно содержать сайт инициации репликации.

В настоящем документе термин «клетка-хозяин» относится к клеткам, в которые могут быть введены векторы, включая, но без ограничения, прокариотические клетки, такие как *E. coli* или *Bacillus subtilis*, клетки грибов, такие как клетки дрожжей или *Aspergillus*, клетки насекомых, такие как клетки дрозофилы S2 или Sf9, или клетки животных, такие как фибробласты, клетки CHO, клетки COS, клетки NSO, клетки HeLa, клетки GS, клетки ВНК, клетки НЕК 293 или клетки человека.

В настоящем документе термин «специфическое связывание» относится к

реакции неслучайного связывания между двумя молекулами, такой как реакция между антителом и антигеном, на который оно нацелено. В некоторых воплощениях антитело, специфично связывающееся с антигеном (или антитело, специфическое в отношении антигена), означает, что антитело связывается с антигеном с аффинностью (K_D), составляющей менее чем приблизительно 10^{-5} М, например менее чем приблизительно 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М или 10^{-10} М или меньше.

В настоящем документе термин « K_D » относится к равновесной константе диссоциации для специфичного взаимодействия антитело-антиген, которую используют для описания аффинности связывания между антителом и антигеном. Меньшая равновесная константа диссоциации указывает на более сильное связывание антитела с антигеном и более высокую аффинность между антителом и антигеном. Как правило, антитела связываются с антигенами (например, белком TIGIT) с равновесной константой диссоциации (K_D), составляющей менее чем приблизительно 10^{-5} М, например менее чем приблизительно 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М или 10^{-10} М или меньше. K_D может быть определена с применением способов, известных специалистам в данной области техники, например с использованием системы от компании Fortebio.

В настоящем документе термины «моноклональное антитело» и «mAb» имеют одинаковое значение и используются взаимозаменяемо; термины «поликлональное антитело» и «pAb» имеют одинаковое значение и используются взаимозаменяемо; термины «полипептид» и «белок» имеют одинаковое значение и используются взаимозаменяемо. Кроме того, в настоящем документе аминокислоты обычно представлены с помощью однобуквенных и трехбуквенных сокращений, известных в данной области техники. Например, аланин может быть представлен как А или Ala.

В настоящем документе термин «фармацевтически приемлемый носитель и/или эксципиент» относится к носителю и/или эксципиенту, который является фармакологически и/или физиологически совместимым с субъектом и активным ингредиентом. Такие носители и/или эксципиенты хорошо известны в данной области техники (см., например, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, edited by Gennaro AR, 19th Ed., Pennsylvania, Mack Publishing Company, 1995), включая, но без ограничения: регуляторы pH, поверхностно-активные вещества, адъюванты и вещества, повышающие ионную силу. Например, регуляторы pH включают, но без ограничения, фосфатный буфер; поверхностно-активные вещества включают, но без ограничения,

катионные, анионные или неионные поверхностно-активные вещества, такие как Tween-80; вещества, повышающие ионную силу, включают, но без ограничения, хлорид натрия.

В настоящем документе термин «эффективное количество» относится к количеству, достаточному для обеспечения или по меньшей мере частичного обеспечения желаемого эффекта. Например, профилактически эффективное количество против заболевания (например, опухоли) относится к количеству, достаточному для предупреждения, остановки развития или задерживания начала заболевания (например, опухоли); терапевтически эффективное количество относится к количеству, достаточному для излечения или по меньшей мере частичной остановки развития заболеваний и их осложнений у пациентов, страдающих от заболевания.

В настоящем документе при упоминании аминокислотной последовательности белка TIGIT (идентификационный номер в базе данных GenBank NCBI: NP_776160.2) последняя включает полноразмерный белок TIGIT или внеклеточный фрагмент TIGIT, называемый TIGIT ECD, или фрагмент, содержащий TIGIT ECD; также включены содержащие полноразмерный белок TIGIT слитые белки или содержащие TIGIT ECD слитые белки, такие как фрагмент, слитый с белковым Fc-фрагментом мышиного или человеческого IgG (mFc или hFc). Однако специалистам в данной области техники будет понятно, что в аминокислотной последовательности белка TIGIT мутации или вариации (включая, но без ограничения, замены, делеции и/или добавления) могут встречаться в природе или могут быть введены искусственно без влияния на биологические функции этого белка. Таким образом, в настоящем изобретении термин «белок TIGIT» должен включать все такие последовательности, включая их природные или искусственные варианты. Кроме того, при описании фрагмента последовательности белка TIGIT также включены соответствующие фрагменты природных или искусственных вариантов этой последовательности.

В настоящем документе термины «гибридома» и «линия клеток гибридомы» используются взаимозаменяемо, и при упоминании терминов «гибридома» и «линия клеток гибридомы» они также включают субклоны и клетки-потомки гибридомы.

В настоящем изобретении термины «первый» (например, первый продукт) и «второй» (например, второй продукт) используются для различения или ясности выражения и не имеют типичных последовательных значений, если не указано иное.

Полезные эффекты настоящего изобретения

Моноклональные антитела согласно настоящему изобретению могут очень хорошо специфично связываться с TIGIT и обладают высокой аффинностью. Они уменьшают ингибирующее действие TIGIT на иммунные клетки, стимулируют активность Т-клеток, обращают вспять истощение NK-клеток и усиливают уничтожающее действие иммунных клеток на опухоли. Их можно применять для получения лекарственного средства для ингибирования TIGIT и лечения или предупреждения заболеваний, таких как опухоли (например, рак печени, рак почки, опухоль головного мозга, уротелиальная карцинома, опухоль кости, холангиокарцинома, немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, рак молочной железы, рак яичника, колоректальный рак, меланома, рак поджелудочной железы, опухоль шейки матки, множественная миелома, лимфома Ходжкина, неходжкинская лимфома, В-лимфома, рак яичника, рак плазматических клеток, рак эндометрия, рак предстательной железы и рак яичка), что представляет перспективу для применения и вывода на рынок.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

ФИГ. 1: результаты анализов активности антител 26B12H1L1, 26B12H2L2, 26B12H2L3 и 26B12H3L2, связывающихся с TIGIT-mFc.

ФИГ. 2: результаты анализов активности антител 26B12H3L3, 26B12H1L4, 26B12H4L1 и 26B12H4L4, связывающихся с TIGIT-mFc.

ФИГ. 3: результаты анализов активности антител 26B12H1L1, 26B12H2L2, 26B12H2L3 и 26B12H3L2, конкурирующих с CD155-hFc-биотин человека за связывание с TIGIT-mFc.

ФИГ. 4: результаты анализов активности антител 26B12H3L3, 26B12H1L4, 26B12H4L1 и 26B12H4L4, конкурирующих с CD155-hFc-биотин человека за связывание с TIGIT-mFc.

ФИГ. 5: результаты анализов по определению константы аффинности 26B12H3L3 в отношении TIGIT-mFc. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 5 нМ, 1,67 нМ, 0,557 нМ, 0,185 нМ и 0,06 нМ, соответственно.

ФИГ. 6: результаты анализов по определению константы аффинности 26B12H1L1 в отношении TIGIT-mFc. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 5 нМ, 1,67 нМ, 0,557 нМ, 0,185 нМ и 0,06 нМ, соответственно.

ФИГ. 7: результаты анализов по определению константы аффинности 26B12H2L2 в отношении TIGIT-mFc. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 5 нМ, 1,67 нМ, 0,557 нМ, 0,185 нМ и 0,06 нМ, соответственно.

ФИГ. 8: результаты анализов по определению константы аффинности 26B12H2L3 в отношении TIGIT-mFc. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 5 нМ, 1,67 нМ, 0,557 нМ, 0,185 нМ и 0,06 нМ, соответственно.

ФИГ. 9: результаты анализов по определению константы аффинности 26B12H3L2 в отношении TIGIT-mFc. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 5 нМ, 1,67 нМ, 0,557 нМ, 0,185 нМ и 0,06 нМ, соответственно.

ФИГ. 10: результаты анализов по определению константы аффинности 26B12H4L4 в отношении TIGIT-mFc. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 5 нМ, 1,67 нМ, 0,557 нМ, 0,185 нМ и 0,06 нМ, соответственно.

ФИГ. 11: результаты анализов по определению константы аффинности 26B12H1L4 в отношении TIGIT-mFc. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 5 нМ, 1,67 нМ, 0,557 нМ, 0,185 нМ и 0,06 нМ, соответственно.

ФИГ. 12: результаты анализов по определению константы аффинности 26B12H4L1 в отношении TIGIT-mFc. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 5 нМ, 1,67 нМ, 0,557 нМ, 0,185 нМ и 0,06 нМ, соответственно.

ФИГ. 13: результаты анализов по определению константы аффинности RG6058 в отношении TIGIT-mFc. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 5 нМ, 1,67 нМ, 0,557 нМ, 0,185 нМ и 0,06 нМ, соответственно.

ФИГ. 14: FACS(сортировка клеток с активированной флуоресценцией)-анализы активности гуманизированных антител 26B12H2L2 и RG6058, связывающихся с поверхностным антигеном TIGIT мембраны клеток 293T-TIGIT.

ФИГ. 15: FACS-анализы активности гуманизированных антител 26B12H2L2 и RG6058, конкурирующих с CD155 за связывание с поверхностным TIGIT мембраны клеток 293T-TIGIT.

ФИГ. 16: FACS-анализы активности гуманизированных антител 26B12H2L2 и RG6058, конкурирующих с CD112 за связывание с поверхностным TIGIT мембраны клеток 293T-TIGIT.

ФИГ. 17: уровни секреции IL-2 после добавления антител к TIGIT к системам Jurkat-TIGIT и HT1080-aCD3scFv.

ФИГ. 18: эффект на трансгенных мышах hTIGIT-BALB/c в модели опухоли СТ26.

ФИГ. 19: изменения массы тела трансгенных мышей hTIGIT-BALB/c в модели опухоли СТ26.

Депонированный биологический материал:

Линия клеток гибридомы LT019 была депонирована в Китайском центре коллекции типовых культур (ССТСС) 23 октября 2020 г. под номером ССТСС С2020208, адрес депозитария: Уханьский университет, Ухань, Китай, почтовый индекс: 430072.

Настоящее изобретение относится к следующим последовательностям 1-26:

1. Аминокислотная последовательность 26B12VH

EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGHSFTSDYAWNWIRQFPGNRLEWMGYISYSDS
TNYNPSLKSRIITRDTSKNQFFLQMNSVTTEDTATYYCARLDYGNYYGGAMDYWGQ
GTSVTVSS (SEQ ID NO: 1)

2. Нуклеотидная последовательность 26B12VH

GAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGACCTGGCCTGGTGAAACCCTCTCAGTCTCTGT
CCCTCACCTGCACTGTCACTGGCCACTCATTACCAGTGATTATGCCTGGAACTGG
ATCCGGCAGTTTCCAGGAAACAGACTGGAGTGGATGGGCTACATAAGCTACAGT
GATAGCACTAACTACAACCCATCTCTCAAAAGTCGAATCTCTATCACTCGAGACA
CATCCAAGAACCAGTTCTTCTTGCAGATGAATTCTGTGACTACTGAGGACACAGC
CACATATTA CTGTGCAAGATTGGACTATGGTAACTACGGTGGGGCTATGGACTAC
TGGGGTCAAGGGACCTCAGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 2)

3. HCDR1: GHSFTSDYA (SEQ ID NO: 3)

4. HCDR2: ISYSDST (SEQ ID NO: 4)

5. HCDR3: ARLDYGNYYGGAMDY (SEQ ID NO: 5)

6. Аминокислотная последовательность 26B12VL

DIVLTQSHEFMSTSLRDRVSITCKSSQHVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYTGV
PDRFTGSGSGTDFTFITSSVKAEDLAVYYCQQHYITPWFGGGKLEIK (SEQ ID NO:
6)

7. Нуклеотидная последовательность 26B12VL

GATATTGTGCTAACTCAGTCTCACGAATTCATGTCCACCTCATTACGAGACAGGG
TCAGCATCACCTGCAAATCCAGTCAACATGTGAGTACTGCTGTAGCCTGGTATCA

ACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACTACTGATTTACTTCGGCATCCTACCGGTAC
 ACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACGGATTTCACTTTCA
 CCATCAGCAGTGTGAAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAACATTA
TATTACTCCGTGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATAAAA (SEQ ID NO:
 7)

8. LCDR1: QHVSTA (SEQ ID NO: 8)

9. LCDR2: SAS (SEQ ID NO: 9)

10. LCDR3: QQHYITPWT (SEQ ID NO: 10)

11. Аминокислотная последовательность 26B12H1

DVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGHSFTSDYAWNWRQFPKGKLEWIGYISYSDST
 NYNPSLKSRTISRDTSKNQFFLQLNSVTAADTATYYCCARLDYGNYGGAMDYWGQ
 TSVTVSS (SEQ ID NO: 11)

12. Нуклеотидная последовательность 26B12H1

GATGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCCCGGACTGGTGAAGCCTTCCCAGACCCTGT
 CTCTGACCTGTACAGTGTCTGGCCACAGCTTCACATCCGACTACGCCTGGA
 ACTGATCAGGCAGTTTCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGGCTACATCTCTTATAGC
GACTCCACCAACTATAATCCCTCTCTGAAGAGCCGGATCACCATCAGCAGAGATA
 CATCCAAGAACCAGTTCTTTCTGCAGCTGAACAGCGTGACAGCCGCCGACACCGC
 CACATACTATTGCGCCCGGCTGGACTACGGCAATTATGGCGGAGCCATGGATTAC
 TGGGGCCAGGGCACCTCCGTGACAGTGAGCTCC (SEQ ID NO: 12)

13. Аминокислотная последовательность 26B12H2

DVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGHSFTSDYAWSWIRQPPKGKLEWIGYISYSDST
 NYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCCARLDYGNYGGAMDYWGQ
 GTSVTVSS (SEQ ID NO: 13)

14. Нуклеотидная последовательность 26B12H2

GATGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGCCAGGACTGGTGAAGCCAAGCCAGACCCTG
 TCCCTGACCTGTACAGTGTCCGGCCACTCTTTTACAAGCGACTACGCCTGGTCTTG
 GATCAGGCAGCCCCCTGGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGCTACATCTCCTATTCT
GACAGCACCAACTATAATCCCTCCCTGAAGTCTCGGGTGACCATCTCTAGAGATA
 CAAGCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCCGTGACCGCAGCAGACACAG
 CCGTGTACTATTGCGCCCGGCTGGACTACGGCAATTATGGCGGAGCCATGGATTA
CTGGGGCCAGGGCACCAGCGTGACAGTGTCTAGC (SEQ ID NO: 14)

15. Аминокислотная последовательность 26B12H3

DVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGHSFTSDYAWSWIRQPPGKGLEWIGYISYSDST
 NYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLDYGNYGGAMDYWGQ
 GTSVTVSS (SEQ ID NO: 15)

16. Нуклеотидная последовательность 26B12H3

GATGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGACTGGTGAAGCCAAGCCAGACCCTG
 TCCCTGACCTGTACAGTGTCCGGCCACTCTTTTACAAGCGACTACGCCTGGTCTTG
 GATCAGACAGCCCCCTGGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGCTACATCTCCTATTCT
GACAGCACCAAACTATAATCCCTCCCTGAAGTCTAGAGTGACCATCTCTGTGGATA
 CAAGCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCCGTGACCGCAGCAGACACAG
 CCGTGTACTATTGCGCCCGGCTGGACTACGGCAATTATGGCGGAGCCATGGATTA
CTGGGGCCAGGGCACCAGCGTGACAGTGTCTAGC (SEQ ID NO: 16)

17. Аминокислотная последовательность 26B12H4

DVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGHSFTSDYAWNWRQFPKGLEWMGYISYSDS
TNYNPSLKSRTISRDTSKNQFFLQLNSVTAADTATYYCARLDYGNYGGAMDYWGQ
 GTSVTVSS (SEQ ID NO: 17)

18. Нуклеотидная последовательность 26B12H4

GATGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCCCCGGACTGGTGAAGCCTTCCCAGACCCTGT
 CTCTGACCTGTACAGTGTCTGGCCACAGCTTCACATCCGACTACGCCTGGAAGT
 GATCAGGCAGTTTCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATGGGCTACATCTCTTATAGC
GACTCCACCAAACTATAATCCCTCTCTGAAGAGCCGGATCACCATCAGCAGAGATA
 CATCCAAGAACCAGTTCTTTCTGCAGCTGAACAGCGTGACAGCCGCCGACACCGC
 CACATACTATTGCGCCCGGCTGGACTACGGCAATTATGGCGGAGCCATGGATTAC
 TGGGGCCAGGGCACCTCCGTGACAGTGAGCTCC (SEQ ID NO: 18)

19. Аминокислотная последовательность 26B12L1

DIQMTQSPKSLSTSVGDRVTITCRSSQHVSTAVAWYQQKPGKSPKLLIYSASRYSGV
 PDRFSGSGSGTDFFTISSVQPEDFATYYCQQHYITPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:
 19)

20. Нуклеотидная последовательность 26B12L1

GACATCCAGATGACCCAGTCCCCTAAGTCCCTGTCTACAAGCGTGGGCGATCGGG
 TGACCATCACATGTAGAAGCTCCCAGCACGTGTCTACCGCAGTGGCATGGTACCA
 GCAGAAGCCAGGCAAGAGCCCTAAGCTGCTGATCTATTCCGCCTCTTACAGGTAT

TCCGGAGTGCCAGACCGGTTTACGCGGCTCCGGCTCTGGCACCGATTTACCTTTA
 CAATCTCTAGCGTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACATACTATTGCCCAGCAGCACTA
CATCACCCCATGGACCTTCGGCGGGCGGCACAAAGCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO:
 20)

21. Аминокислотная последовательность 26B12L2

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRSSQHVESTALAWYQQKPGKSPKLLIYSASSRYSGV
 PDRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDFATYYCQQHYITPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:
 21)

22. Нуклеотидная последовательность 26B12L2

GACATCCAGATGACCCAGTCCCCTAGCTCCCTGTCTGCCAGCGTGGGCGATAGGG
 TGACCATCACATGTAGATCTAGCCCAGCACGTGTCTACAGCCCTGGCATGGTACCA
 GCAGAAGCCAGGCAAGAGCCCTAAGCTGCTGATCTACTCCGCCTCCTCTAGGTAT
 TCTGGAGTGCCAGACCGGTTTTCCGGCTCTGGCAGCGGCACCGATTTACCTTTAC
 AATCAGCTCCCTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACATACTATTGCCCAGCAGCACTAT
ATCACCCCATGGACCTTCGGCGGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO:
 22)

23. Аминокислотная последовательность 26B12L3

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQHVESTALAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLQSGV
 PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYITPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:
 23)

24. Нуклеотидная последовательность 26B12L3

GACATCCAGATGACCCAGTCCCCTAGCTCCCTGAGCGCCTCCGTGGGCGATAGGG
 TGACCATCACATGTAGAGCCTCTCAGCACGTGAGCACAGCCCTGGCATGGTACCA
 GCAGAAGCCAGGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTATAGCGCCTCTAGCCTGCAG
 TCCGGAGTGCCATCTCGGTTCTCTGGCAGCGGCTCCGGAACCGACTTTACCCTGA
 CAATCTCCTCTCTGCAGCCAGAGGATTTGCCACATACTATTGCCCAGCAGCACTA
CATCACCCCATGGACCTTCGGCGGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO:
 24)

25. Аминокислотная последовательность 26B12L4

DIQMTQSPKSMSTSVGDRVITICRSSQHVESTAVAWYQQKPGKSPKLLIYSSASYRYS
 GVPDRFSGSGSGTDFTFTISSVQPEDFATYYCQQHYITPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:
 25)

26. Нуклеотидная последовательность 26B12L4

GACATCCAGATGACCCAGTCCCCTAAGTCCATGTCTACAAGCGTGGGCGACAGGG
 TGACCATCACATGTAGAAGCTCCCAGCACGTGTCTACCGCAGTGGCATGGTACCA
 GCAGAAGCCAGGCAAGAGCCCTAAGCTGCTGATCTATTCCGCCTCTTACAGGTAT
 TCCGGAGTGCCAGACCGGTTTAGCGGCTCCGGCTCTGGCACCGATTTACSTTTA
 CAATCTCTAGCGTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACATACTATTGCCAGCAGCACTA
CATCACCCCATGGACSTTCGGCGGCGGCACAAAGCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO:
 26)

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Воплощения настоящего изобретения будут подробно описаны ниже со ссылкой на примеры. Специалистам в данной области техники будет понятно, что следующие примеры предназначены только для иллюстрации настоящего изобретения и не должны рассматриваться как ограничивающие объем настоящего изобретения. Примеры, в которых не указаны конкретные технологии или условия, выполнены в соответствии с технологиями или условиями, описанными в публикациях существующего уровня техники (например, см. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, authored by J. Sambrook et al., and translated by Huang Peitang et al., third edition, Science Press), или в соответствии с руководством по применению продукта. Используемые реагенты или инструменты являются обычными коммерчески доступными продуктами, если их производители не указаны. Например, клетки 293Т можно приобрести в Американской коллекции типовых культур (АТСС).

В следующих примерах настоящего изобретения используемые мыши BALB/c были приобретены в Медицинском центре лабораторных животных, Гуандун.

В следующих примерах настоящего изобретения в отношении последовательности антитела RG6058, использованного в качестве положительного контроля, можно обратиться к последовательности 34 и последовательности 36 в патентной публикации Китая CN108290946A.

В следующих примерах настоящего изобретения используемая линия клеток 293Т-TIGIT была сконструирована компанией Akeso Biopharma Co. Ltd. Линия клеток 293Т-TIGIT была получена путем вирусной трансфекции клеток HEK293Т с использованием лентивирусных систем третьего поколения (см., например, A Third Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System. Dull T, Zufferey R,

Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, and Naldini L., *J Virol.*, 1998. 72(11):8463-8471), где использованный лентивирусный вектор экспрессии представлял собой pCDH-CMV-PD-1FL-Puro (TIGIT, идентификационный номер в базе данных Genbank: NP_776160.2; вектор pCDH-CMV-Puro, приобретенный в компании Youbio, номер по каталогу VT1480).

Пример 1: Получение антитела к TIGIT 26B12

1. Получение линии клеток гибридомы LT019

Антиген, использованный для получения антитела к TIGIT, представлял собой TIGIT-mFc человека (идентификационный номер TIGIT в базе данных GenBank: NP_776160.2). Клетки селезенки иммунизированных мышей подвергали слиянию с клетками миеломы мышей с получением клеток гибридомы. Клетки гибридомы подвергали скринингу посредством непрямого ELISA (иммуноферментный анализ) с TIGIT-mFc человека, взятыми в качестве антигенов, для получения клеток гибридомы, способных секретировать антитела, специфично связывающиеся с TIGIT. Клетки гибридомы, полученные путем скрининга, подвергали лимитирующему разведению для получения стабильной линии клеток гибридомы. Указанная выше линия клеток гибридомы была обозначена как линия клеток гибридомы LT019, а моноклональное антитело, секретируемое этой линией клеток, было обозначено как 26B12.

Линия клеток гибридомы LT019 была депонирована в Китайском центре коллекции типовых культур (ССТСС) 23 октября 2020 г. под номером ССТСС С2020208, адрес депозитария: Уханьский университет, Ухань, Китай, почтовый индекс: 430072.

2. Получение антитела к TIGIT 26B12

Линию клеток LT019, полученную как описано выше, культивировали в среде с определенным химическим составом (среда CD, содержащая 1% пенициллина-стрептомицина) при 37°C/5% CO₂. Через 7 суток супернатант культуры клеток собирали, подвергали высокоскоростному центрифугированию и вакуумной фильтрации через микрофильтрационную мембрану и очищали с использованием колонки HiTrap Protein A HP с получением антитела 26B12.

Пример 2: Анализ последовательности антитела к TIGIT 26B12

мРНК (матричная РНК) экстрагировали из линии клеток LT019, культивируемой согласно Примеру 1, в соответствии с методом, описанным в руководстве к набору

RNAprep pure Cell/Bacteria Kit (Tiangen, номер по каталогу DP430).

кДНК (комплементарная ДНК) синтезировали в соответствии с руководством к системе для RT-PCR (полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией) Invitrogen SuperScript® III First-Strand Synthesis System и амплифицировали посредством PCR (полимеразная цепная реакция).

Продукты PCR-амплификации непосредственно подвергали ТА-клонированию в соответствии с руководством к набору pEASY-T1 Cloning Kit (Transgen CT101).

Продукты ТА-клонирования непосредственно секвенировали, и результаты секвенирования представляют собой следующие:

Нуклеотидная последовательность варибельной области тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO: 2 и имеет длину 363 п.о. (пар оснований).

Кодируемая аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO: 1 и имеет длину, составляющую 121 аминокислоту,

где последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 тяжелой цепи представлены в SEQ ID NO: 3, 4 и 5, соответственно.

Нуклеотидная последовательность варибельной области легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 7 и имеет длину 321 п.о.

Кодируемая аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO: 6 и имеет длину, составляющую 107 аминокислот,

где последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 легкой цепи представлены в SEQ ID NO: 8, 9 и 10, соответственно.

Пример 3: Конструирование и получение легких и тяжелых цепей гуманизованных антител к TIGIT человека

1. Конструирование легких и тяжелых цепей гуманизованных антител к TIGIT человека 26B12H1L1, 26B12H4L1, 26B12H2L2, 26B12H3L2, 26B12H2L3, 26B12H3L3, 26B12H1L4 и 26B12H4L4

На основе трехмерной кристаллической структуры белка TIGIT человека и последовательности антитела 26B12, полученной в Примере 2, с помощью компьютера была построена модель антитела, и в соответствии с этой моделью были сконструированы мутации для получения последовательностей варибельных областей антител 26B12H1L1, 26B12H4L1, 26B12H2L2, 26B12H3L2, 26B12H2L3, 26B12H3L3, 26B12H1L4 и 26B12H4L4 (последовательности константных областей антител из базы

данных NCBI: константная область тяжелой цепи представляет собой С-область цепи гамма-1 Ig, номер доступа: P01857; константная область легкой цепи представляет собой С-область цепи каппа Ig, номер доступа: P01834).

Сконструированные последовательности переменных областей приведены в таблице А ниже.

№	Название	Аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи SEQ ID NO:	Нуклеотидная последовательность переменной области тяжелой цепи SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи SEQ ID NO:	Нуклеотидная последовательность переменной области легкой цепи SEQ ID NO:
1	26B12H1L1	11	12	19	20
2	26B12H4L1	17	18	19	20
3	26B12H2L2	13	14	21	22
4	26B12H2L3	13	14	23	24
5	26B12H3L2	15	16	21	22
6	26B12H3L3	15	16	23	24
7	26B12H1L4	11	12	25	26
8	26B12H4L4	17	18	25	26

Для указанных выше 8 антител 26B12H1L1, 26B12H4L1, 26B12H2L2, 26B12H3L2, 26B12H2L3, 26B12H3L3, 26B12H1L4 и 26B12H4L4 длина нуклеотидных последовательностей переменных областей тяжелой цепи составляла 363 п.о., и длина кодируемых аминокислотных последовательностей составляла 121 а/к (аминокислот); длина нуклеотидных последовательностей переменных областей легкой цепи составляла 321 п.о., и длина кодируемых аминокислотных последовательностей составляла 107 а/к.

Более того, указанные выше 8 антител содержали одинаковые HCDR1-HCDR3 и LCDR1-LCDR3:

последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 представлены в SEQ ID NO: 3, 4 и 5, соответственно; и

последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 представлены в SEQ ID NO: 8, 9 и 10, соответственно.

2. Получение гуманизированных антител 26B12H1L1, 26B12H4L1, 26B12H2L2,

26B12H3L2, 26B12H2L3, 26B12H3L3, 26B12H1L4 и 26B12H4L4

Все константные области тяжелой цепи представляли собой С-область цепи гамма-1 Ig, номер доступа: P01857; все константные области легкой цепи представляли собой С-область цепи каппа Ig, номер доступа: P01834.

кДНК тяжелой цепи и кДНК легкой цепи 26B12H1L1, кДНК тяжелой цепи и кДНК легкой цепи 26B12H4L1, кДНК тяжелой цепи и кДНК легкой цепи 26B12H2L2, кДНК тяжелой цепи и кДНК легкой цепи 26B12H3L2, кДНК тяжелой цепи и кДНК легкой цепи 26B12H2L3, кДНК тяжелой цепи и кДНК легкой цепи 26B12H3L3, кДНК тяжелой цепи и кДНК легкой цепи 26B12H1L4, кДНК тяжелой цепи и кДНК легкой цепи 26B12H2L4 и кДНК тяжелой цепи и кДНК легкой цепи 26B12H4L4 были по отдельности клонированы в векторы pUC57simple (предоставленные компанией Genscript) с получением pUC57simple-26B12H1, pUC57simple-26B12L1; pUC57simple-26B12H4, pUC57simple-26B12L1; pUC57simple-26B12H2, pUC57simple-26B12L2; pUC57simple-26B12H3, pUC57simple-26B12L2; pUC57simple-26B12H2, pUC57simple-26B12L3; pUC57simple-26B12H3, pUC57simple-26B12L3; pUC57simple-26B12L3; pUC57simple-26B12H1, pUC57simple-26B12L4; pUC57simple-26B12H2, pUC57simple-26B12L4; и pUC57simple-26B12H4, pUC57simple-26B12L4, соответственно. Со ссылкой на стандартные методики, описанные в источнике *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Second Edition), полноразмерные гены тяжелой и легкой цепей, синтезированные путем расщепления рестриктазами EcoRI и HindIII, субклонировали в вектор экспрессии pcDNA3.1 путем расщепления рестриктазами EcoRI и HindIII с получением экспрессионных плазмид pcDNA3.1-26B12H1, pcDNA3.1-26B12L1, pcDNA3.1-26B12H4, pcDNA3.1-26B12H2, pcDNA3.1-26B12L2, pcDNA3.1-26B12H3, pcDNA3.1-26B12L3 и pcDNA3.1-26B12L4, и гены тяжелой/легкой цепи рекомбинантных экспрессионных плазмид дополнительно секвенировали. Затем рекомбинантные плазмиды для экспрессии сконструированных комбинаций генов, содержащие соответствующие легкую и тяжелую цепи (pcDNA3.1-26B12H1/pcDNA3.1-26B12L1, pcDNA3.1-26B12H4/pcDNA3.1-26B12L1, pcDNA3.1-26B12H2/pcDNA3.1-26B12L2, pcDNA3.1-26B12H3/pcDNA3.1-26B12L2, pcDNA3.1-26B12H2/pcDNA3.1-26B12L3, pcDNA3.1-26B12H3/pcDNA3.1-26B12L3, pcDNA3.1-26B12H1/pcDNA3.1-26B12L4 и pcDNA3.1-26B12H4/pcDNA3.1-26B12L4), по отдельности подвергали совместной трансфекции клеток 293F, и культуры собирали и

очищали. После подтверждения последовательностей были получены не содержащие эндотоксинов экспрессионные плазмиды, которыми временно трансфицировали клетки НЕК293 для экспрессии антител. Через 7 суток культивирования клеточные культуры собирали и подвергали аффинной очистке на колонке с белком А для получения гуманизированных антител.

Пример 4: Анализы ELISA активности антител, связывающихся с антигеном TIGIT-mFc

Стадии эксперимента: микропланшет покрывали антителом козы к Fc IgG мыши в концентрации 2 мкг/мл и инкубировали при 4°C в течение 16 ч. После инкубации микропланшет, покрытый антителом козы к Fc IgG мыши, один раз промывали PBST (забуференный фосфатом физиологический раствор с добавлением твина) и затем блокировали раствором PBST, содержащим 1% BSA (бычий сывороточный альбумин), в качестве блокирующего раствора для микропланшета в течение 2 ч. После блокирования микропланшет 3 раза промывали PBST. Далее добавляли 1 мкг/мл антигена TIGIT-mFc человека, и планшет инкубировали при 37°C в течение 30 мин и затем 3 раза промывали PBST. В лунки микропланшета добавляли антитела, последовательно разведенные раствором PBST. Граденты разведения антител приведены в Таблице 1 и Таблице 2. Микропланшет, содержащий исследуемые антитела, инкубировали при 37°C в течение 30 мин и затем 3 раза промывали PBST. После промывки добавляли рабочий раствор вторичного меченого HRP (пероксидаза хрена) антитела козы к Fc IgG человека, разбавленного в соотношении 1:5000, и микропланшет инкубировали при 37°C в течение 30 мин. После инкубации планшет 4 раза промывали PBST, добавляли ТМВ (тетраметилбензидин) (Neogen, 308177) для образования окрашенного соединения в темноте на 4 мин, затем добавляли останавливающий раствор для завершения хромогенной реакции. Микропланшет незамедлительно помещали в устройство для прочтения микропланшетов и считывали значение OD (оптическая плотность) для каждой лунки микропланшета при 450 нм. Данные подвергали анализу и обработке с использованием программного обеспечения SoftMax Pro 6.2.1.

Результаты связывания антител с антигеном TIGIT-mFc представлены на ФИГ. 1 и 2. Значения OD для всех доз приведены в Таблице 1 и Таблице 2. EC₅₀ антител, связывающихся с антигеном, рассчитывали путем подбора аппроксимирующей кривой

с использованием концентраций антител в качестве абсцисс и значений поглощения в качестве ординат, и результаты представлены в Таблице 1 и Таблице 2 и на ФИГ. 1 и ФИГ. 2.

Таблица 1: Результаты анализов активности 26B12H1L1, 26B12H2L2, 26B12H2L3, 26B12H3L2 и RG6058, связывающихся с TIGIT-mFc

Покрытие: антитело козы к Fc IgG мыши (2 мкг/мл)										
Разведение антитела (мкг/мл)	TIGIT-mFc (1 мкг/мл)									
	26B12H1L1		26B12H2L2		26B12H2L3		26B12H3L2		RG6058	
0,3330	2,789	2,701	2,623	2,609	2,560	2,542	2,513	2,430	2,644	2,689
0,1110	2,722	2,771	2,460	2,572	2,413	2,528	2,368	2,394	2,516	2,863
0,0370	2,539	2,676	2,322	2,253	2,162	2,137	2,142	2,292	2,332	2,605
0,0123	2,001	2,126	2,001	1,965	1,853	1,811	1,706	1,861	1,855	2,028
0,0041	1,262	1,349	1,211	1,221	1,038	1,103	1,106	1,092	1,142	1,263
0,0014	0,593	0,613	0,542	0,627	0,506	0,544	0,546	0,527	0,569	0,602
0,0005	0,264	0,265	0,249	0,258	0,237	0,243	0,224	0,229	0,238	0,254
0,0000	0,056	0,051	0,053	0,046	0,052	0,049	0,049	0,050	0,053	0,049
Вторичное антитело	Меченное HRP антитело козы к Fc IgG человека (1:5000)									
EC ₅₀ (нМ)	0,034		0,033		0,040		0,037		0,036	

Таблица 2: Результаты анализов активности 26B12H3L3, 26B12H1L4, 26B12H4L1, 26B12H4L4 и RG6058, связывающихся с TIGIT-mFc

Покрытие: антитело козы к Fc IgG мыши (2 мкг/мл)										
Разведение антитела (мкг/мл)	TIGIT-mFc (1 мкг/мл)									
	26B12H3L3		26B12H1L4		26B12H4L1		26B12H4L4		RG6058	
0,3330	2,736	2,788	2,639	2,604	2,709	2,829	2,728	2,608	2,963	3,089
0,1110	2,707	2,774	2,469	2,422	2,625	2,587	2,626	2,788	2,915	3,119
0,0370	2,546	2,538	2,568	2,451	2,392	2,699	2,679	2,660	2,830	2,797
0,0123	1,861	1,881	2,049	1,882	2,113	2,091	1,987	2,045	2,237	2,237
0,0041	1,074	1,012	1,232	1,266	1,252	1,279	1,265	1,239	1,254	1,258
0,0014	0,483	0,477	0,593	0,580	0,582	0,592	0,589	0,593	0,569	0,593
0,0005	0,217	0,211	0,246	0,263	0,256	0,261	0,253	0,253	0,244	0,248
0,0000	0,065	0,060	0,053	0,051	0,051	0,051	0,052	0,054	0,065	0,061
Вторичное антитело	Меченное HRP антитело козы к Fc IgG человека (1:5000)									
EC ₅₀ (нМ)	0,048		0,031		0,033		0,034		0,039	

Результаты показывают, что все антитела 26B12H1L1, 26B12H4L1, 26B12H2L2, 26B12H3L2, 26B12H2L3, 26B12H3L3, 26B12H1L4 и 26B12H4L4 способны эффективно связываться с TIGIT-mFc человека дозозависимым образом, и их связывающие активности сравнимы с активностью лекарственного средства RG6058, использованного в качестве положительного контроля для той же мишени, что указывает на то, что антитела 26B12H1L1, 26B12H4L1, 26B12H2L2, 26B12H3L2, 26B12H2L3, 26B12H3L3, 26B12H1L4 и 26B12H4L4 эффективно связываются с TIGIT.

Пример 5: Конкурентные анализы ELISA активности антител, конкурирующих с CD155-hFc-биотин за связывание с TIGIT-mFc

Стадии эксперимента: микропланшет покрывали TIGIT-mFc в концентрации 2 мкг/мл и инкубировали при 4°C в течение ночи. После инкубации микропланшет, покрытый антигеном, один раз промывали PBST и затем блокировали раствором PBST, содержащим 1% BSA, в качестве блокирующего раствора для микропланшета в течение 2 ч. После блокирования микропланшет 3 раза промывали PBST. В микропланшет добавляли антитела, последовательно разведенные раствором PBST. Концентрации антител приведены в Таблице 3 и Таблице 4. После инкубации микропланшета при комнатной температуре в течение 10 мин добавляли равные объемы 2 мкг/мл CD155-hFc-биотин (конечная концентрация: 1 мкг/мл) и хорошо перемешивали с антителами. Микропланшет инкубировали при 37°C в течение 30 мин и затем 3 раза промывали PBST. После промывки добавляли рабочий раствор SA-HRP (меченный HRP стрептавидин), разбавленного в соотношении 1:4000, и микропланшет инкубировали при 37°C в течение 30 мин. После инкубации планшет промывали 4 раза PBST, добавляли TMB (Neogen, 308177) для образования окрашенного соединения в темноте на 5 мин, затем добавляли останавливающий раствор для завершения хромогенной реакции. Микропланшет незамедлительно помещали в устройство для прочтения микропланшетов и считывали значение OD для каждой лунки микропланшета при 450 нм. Данные подвергали анализу и обработке с использованием программного обеспечения SoftMax Pro 6.2.1.

Результаты активности антител, конкурирующих с CD155-hFc-биотин за связывание с TIGIT-mFc, представлены в Таблице 3 и Таблице 4. EC₅₀ антител, конкурирующих с CD155-hFc-биотин за связывание с TIGIT-mFc, рассчитывали путем подбора аппроксимирующей кривой с использованием концентраций антител в

качестве абсцисс и значений поглощения в качестве ординат, и результаты представлены в Таблице 3 и Таблице 4 и на ФИГ. 3 и ФИГ. 4 ниже.

Таблица 3: Результаты анализов активности 26B12H1L1, 26B12H2L2, 26B12H2L3, 26B12H3L2 и RG6058, конкурирующих с CD155-hFc-биотин человека за связывание с TIGIT-mFc

Разведение антитела	Покрытие антигеном: TIGIT-mFc (2 мкг/мл)									
	26B12H1L1		26B12H2L2		26B12H2L3		26B12H3L2		RG6058	
3 мкг/мл	0,091	0,097	0,101	0,110	0,106	0,117	0,107	0,113	0,119	0,120
1:3	0,088	0,085	0,082	0,092	0,098	0,100	0,101	0,102	0,104	0,112
1:9	0,104	0,099	0,091	0,097	0,107	0,110	0,121	0,120	0,114	0,121
1:27	0,533	0,491	0,410	0,538	0,510	0,537	0,492	0,549	0,528	0,532
1:81	1,026	1,035	0,996	1,025	0,961	0,990	0,948	1,059	0,951	1,011
1:243	1,210	1,251	1,222	1,221	1,142	1,195	1,089	1,217	1,168	1,209
1:729	1,287	1,360	1,274	1,242	1,201	1,287	1,120	1,236	1,209	1,251
0	1,347	1,387	1,315	1,296	1,279	1,307	1,263	1,340	1,295	1,354
CD155-hFc-биотин (1 мкг/мл)										
SA-HRP (1:4000)										
EC ₅₀ (нМ)	0,255		0,254		0,266		0,283		0,254	

Таблица 4: Результаты анализов активности 26B12H3L3, 26B12H1L4, 26B12H4L1, 26B12H4L4 и RG6058, конкурирующих с CD155-hFc-биотин человека за связывание с TIGIT-mFc

Разведение антитела	Покрытие антигеном: TIGIT-mFc (2 мкг/мл)									
	26B12H3L3		26B12H1L4		26B12H4L1		26B12H4L4		RG6058	
3 мкг/мл	0,087	0,085	0,091	0,084	0,102	0,086	0,091	0,085	0,091	0,093
1:3	0,083	0,082	0,077	0,086	0,086	0,086	0,084	0,082	0,089	0,084
1:9	0,139	0,146	0,094	0,096	0,106	0,102	0,103	0,103	0,101	0,100
1:27	0,646	0,650	0,449	0,495	0,495	0,561	0,516	0,532	0,530	0,539
1:81	1,031	1,027	0,938	0,967	0,931	1,030	0,974	0,999	0,946	1,037
1:243	1,239	1,294	1,171	1,224	1,180	1,232	1,131	1,218	1,152	1,223
1:729	1,318	1,378	1,336	1,382	1,278	1,292	1,123	1,335	1,302	1,346
0	1,410	1,393	1,341	1,361	1,357	1,360	1,258	1,364	1,380	1,427
CD155-hFc-биотин (1 мкг/мл)										
SA-HRP (1:4000)										
EC ₅₀ (нМ)	0,294		0,217		0,250		0,271		0,236	

Результаты показывают, что в одних и тех же экспериментальных условиях

26B12H3L3	0,09	9,64E-11	2,48E+06	3,22E+05	2,39E-04	8,57E-05	0,05-0,13
26B12H1L1	0,15	1,64E-11	5,44E+06	1,92E+05	8,93E-05	3,36E-05	0,06-0,17
26B12H2L2	0,14	8,40E-12	5,47E+06	2,55E+05	4,60E-05	4,40E-05	0,07-0,17
26B12H2L3	0,12	4,85E-11	3,29E+06	2,53E+05	1,59E-04	5,92E-05	0,15-0,31
26B12H3L2	0,12	5,40E-11	3,94E+06	3,60E+05	2,13E-04	7,86E-05	0,13-0,17
26B12H4L4	0,13	3,69E-11	2,81E+06	1,38E+05	1,04E-04	3,23E-05	0,14-0,20
26B12H1L4	0,12	4,63E-11	2,94E+06	1,96E+05	1,36E-04	4,88E-05	0,01-0,15
26B12H4L1	0,12	8,57E-12	2,90E+06	1,34E+05	2,48E-05	3,11E-05	0,11-0,18
RG6058	0,16	3,16E-11	4,56E+06	1,84E+05	1,44E-04	3,46E-05	0,01-0,18

K_D представляет собой константу аффинности; $K_D = k_{dis}/k_{on}$.

Результаты показывают, что константы аффинности гуманизированных антител 26B12H3L3, 26B12H1L1, 26B12H2L2, 26B12H2L3, 26B12H3L2, 26B12H4L4, 26B12H1L4, 26B12H4L1 и RG6058 в отношении TIGIT-mFc составляли 9,64E-11 M, 1,64E-11 M, 8,40E-12 M, 4,85E-11 M, 5,40E-11 M, 3,69E-11 M, 4,63E-11 M, 8,57E-12 M и 3,16E-11 M, соответственно.

Результаты показывают, что в соответствии с уровнем аффинности в отношении TIGIT-mFc антитела к TIGIT можно расположить в порядке убывания следующим образом: 26B12H2L2, 26B12H4L1, 26B12H1L1, RG6058, 26B12H4L4, 26B12H1L4, 26B12H2L3, 26B12H3L2, 26B12H3L3. Среди них гуманизированные антитела 26B12H2L2, 26B12H4L1 и 26B12H1L1 характеризуются большей аффинностью, чем использованное в качестве положительного контроля лекарственное средство RG6058, и 26B12H4L4 характеризуется аффинностью, сравнимой с аффинностью использованного в качестве положительного контроля лекарственного средства RG6058.

Пример 7: FACS-анализы активности гуманизированных антител 26B12H2L2 и RG6058, связывающихся с поверхностным антигеном TIGIT мембраны клеток 293T-TIGIT

Методика проведения эксперимента:

Клетки 293T трансфицировали вектором plenti6.3/V5-TIGITFL-BSD, кодирующим TIGIT (вектор pLenti6.3 был приобретен в компании Invitrogen), и с помощью скрининга получали клетки клеточной линии 293T-TIGIT, стабильно экспрессирующие TIGIT.

Клетки 293T-TIGIT собирали (среда DMEM (модифицированная Дульбекко

среда Игла) плюс 10% FBS (фетальная бычья сыворотка)) и центрифугировали в течение 5 мин, и супернатант удаляли. Клетки ресуспендировали и подсчитывали, и определяли жизнеспособность клеток (P7, 95,79%). Клетки разбавляли, добавляли 300 тысячи клеток в каждую лунку прозрачного 96-луночного планшета с лунками с V-образным дном, и в каждую пробирку добавляли 200 мкл 1% PBSA (бычьего сывороточного альбумина, растворенного в забуференном фосфатом физиологическом растворе). Смеси центрифугировали в течение 5 мин, и супернатанты удаляли. В соответствии со схемой эксперимента в каждую лунку добавляли 100 мкл антител (конечная концентрация: 300 нМ, 100 нМ, 33,3 нМ, 11,1 нМ, 3,7 нМ, 1,23 нМ, 0,41 нМ, 0,041 нМ и 0,0041 нМ), и были приготовлены холостой контроль и контроль изотипа. Планшет инкубировали на льду в течение 60 мин. В каждую пробирку добавляли 200 мкл 1% PBSA. Смеси центрифугировали в течение 5 мин и супернатанты удаляли. Планшет промывали дважды. К каждому образцу добавляли меченное FITC (флуоресцинизиотиоцианат) антитело козы к IgG человека (разбавленное в 500 раз PBSA), и смеси инкубировали на льду в темноте в течение 40 мин. В каждую пробирку добавляли 200 мкл PBSA. Смеси центрифугировали в течение 5 мин, и супернатанты удаляли. Клетки ресуспендировали путем добавления 200 мкл PBSA, и суспензии переносили в пробирки для проточной цитометрии для измерения средней интенсивности флуоресценции клеток при каждой концентрации с помощью проточного цитометра.

Таблица 6: FACS-анализы активности гуманизированных антител 26B12H2L2 и RG6058, связывающихся с поверхностным антигеном TIGIT клеточной мембраны клеток 293T-TIGIT

Антитело/ концентра- ция (нМ)	Средняя интенсивность флуоресценции									EC ₅₀ (нМ)
	300	100	33,33	11,1	3,7	1,23	0,41	0,041	0,0041	
RG6058	505,61	554,87	493,98	537,75	431,36	266,73	109,14	24,47	14,61	1,257
26B12H2L2	514,58	467,29	412,32	645,99	466,99	320,40	122,58	28,76	12,66	0,917

Результаты эксперимента представлены в Таблице 6 и на ФИГ. 14. EC₅₀ для связывания антитела RG6058, использованного в качестве положительного контроля, с поверхностным антигеном TIGIT клеточной мембраны составляла 1,257 нМ, и EC₅₀ для связывания гуманизированного антитела 26B12H2L2 с поверхностным антигеном

TIGIT клеточной мембраны составляла 0,917 нМ.

Результаты эксперимента демонстрируют, что гуманизованное антитело 26B12H2L2 обладает большей связывающей способностью в отношении поверхностного антигена TIGIT клеточной мембраны, чем использованное в качестве положительного контроля антитело RG6058.

Пример 8: FACS-анализы активности гуманизованных антител 26B12H2L2 и RG6058, конкурирующих с CD155 или CD112 за связывание с поверхностным антигеном TIGIT клеточной мембраны клеток 293T-TIGIT

Методика проведения эксперимента: клетки 293T-TIGIT собирали и центрифугировали в течение 5 мин, и супернатант удаляли. Клетки ресуспендировали и подсчитывали, и определяли жизнеспособность клеток (94,95%). Клетки разбавляли, добавляли 300 тыс. клеток в каждую лунку прозрачного 96-луночного планшета с лунками V-образным дном, и в каждую пробирку добавляли 200 мкл 1% PBSA. Смеси центрифугировали в течение 5 мин, и супернатанты удаляли. В соответствии со схемой эксперимента в каждую лунку добавляли 100 мкл антител (конечная концентрация: 300 нМ, 100 нМ, 33,3 нМ, 11,1 нМ, 3,7 нМ, 1,23 нМ, 0,123 нМ и 0,0123 нМ), и были приготовлены холостой контроль и контроль изотипа. Планшет инкубировали на льду в течение 30 мин. К каждому образцу добавляли CD155 (конечная концентрация: 10 нМ) или CD112 (конечная концентрация: 30 нМ), и смеси инкубировали на льду в темноте в течение 60 мин. Затем в каждую пробирку добавляли 200 мкл 1% PBSA. Смеси центрифугировали в течение 5 мин, и супернатанты удаляли. Планшет промывали дважды. К каждому образцу добавляли меченное APC (аллофикоцианином) антитело козы к IgG мыши (минимальная x-реактивность) (разбавленное в 300 раз PBSA), и смеси инкубировали на льду в темноте в течение 40 мин. В каждую пробирку добавляли 200 мкл PBSA. Смеси центрифугировали в течение 5 мин, и супернатанты удаляли. Клетки ресуспендировали путем добавления 200 мкл PBSA, и суспензии переносили в пробирки для проточной цитометрии для измерения средней интенсивности флуоресценции клеток при каждой концентрации с помощью проточного цитометра.

Результаты эксперимента представлены в Таблице 7 и на ФИГ. 15, а также в Таблице 8 и на ФИГ. 16.

Таблица 7: FACS-анализы активности гуманизированных антител 26B12H2L2 и RG6058, конкурирующих с CD155 за связывание с поверхностным антигеном TIGIT клеточной мембраны клеток 293T-TIGIT

Антитело/ концентрация (нМ)	Средняя интенсивность флуоресценции								EC ₅₀ (нМ)
	300	100	33,3	11,1	3,7	1,23	0,123	0,0123	
RG6058	8,85	7,44	7,6	7,71	52,1	239	530	436	1,212
26B12H2L2	8,3	7,64	7,83	8,2	36,1	200	541	449	1,049

Таблица 8: FACS-анализы активности гуманизированных антител 26B12H2L2 и RG6058, конкурирующих с CD112 за связывание с поверхностным антигеном TIGIT клеточной мембраны клеток 293T-TIGIT

Антитело/ концентрация (нМ)	Средняя интенсивность флуоресценции								EC ₅₀ (нМ)
	300	100	33,3	11,1	3,7	1,23	0,123	0,0123	
RG6058	20,1	17,8	18	19,2	37,1	72	129	126	1,224
26B12H2L2	21,4	19,2	20,3	19,8	37,1	73,1	131	134	1,140

Результаты показывают, что EC₅₀ использованного в качестве положительного контроля антитела RG6058, конкурирующего с CD155 за связывание с TIGIT, составляла 1,212 нМ, и EC₅₀ гуманизированного антитела 26B12H2L2, конкурирующего с CD155 за связывание с TIGIT, составляла 1,049 нМ; EC₅₀ использованного в качестве положительного контроля антитела RG6058, конкурирующего с CD112 за связывание с TIGIT, составляла 1,224 нМ, и EC₅₀ гуманизированного антитела 26B12H2L2, конкурирующего с CD112 за связывание с TIGIT, составляла 1,140 нМ.

Результаты эксперимента демонстрируют, что гуманизированное антитело 26B12H2L2 обладает большей способностью конкурировать с CD155 или CD112 за связывание с поверхностным антигеном TIGIT клеточной мембраны, чем использованное в качестве положительного контроля антитело RG6058.

Пример 9: Реакция смешанной культуры лимфоцитов после добавления антител к TIGIT к клеточным системам Jurkat-TIGIT и HT1080-aCD3scFv

Методика проведения эксперимента:

Клетки Jurkat трансфицировали вектором plenti6.3/V5-TIGITFL-BSD,

кодирующим TIGIT (вектор pLenti6.3 был приобретен в компании Invitrogen), и с помощью скрининга получали клетки клеточной линии Jurkat-TIGIT, стабильно экспрессирующие TIGIT; клетки HT-1080 трансфицировали вектором pCDH-aCD3scFv-puro, кодирующим антитело к CD3 (вектор pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro был приобретен в компании Youbio), и с помощью скрининга получали клетки клеточной линии HT1080-aCD3scFv, стабильно экспрессирующие scFv к CD3.

Клетки Jurkat-TIGIT и HT1080-aCD3scFv собирали в логарифмической фазе роста. В каждую лунку 96-луночных планшетов добавляли 50 тысяч клеток Jurkat-TIGIT и 10 тысяч клеток HT1080-aCD3scFv. Добавляли разбавленные антитела (конечная концентрация: 10 нМ, 50 нМ и 250 нМ) и антитело к CD28 человека (3 мкг/мл). Планшеты инкубировали в инкубаторе в течение 48 ч. Культуральные супернатанты собирали и подвергали анализу на содержание IL-2 с использованием набора для определения IL-2 методом ELISA.

Результаты эксперимента представлены на ФИГ. 17.

Результаты показывают, что как гуманизованное антитело 26B12H2L2, так и использованное в качестве положительного контроля антитело RG6058 были способны стимулировать секрецию IL-2 в исследованных системах, и гуманизованное антитело 26B12H2L2 стимулировало секрецию IL-2 до уровней, сходных с таковыми для RG6058, в этих концентрациях (10 нМ, 50 нМ и 250 нМ).

Результаты демонстрируют, что способность гуманизованного антитела 26B12H2L2 индуцировать секрецию IL-2 клетками сравнима с аналогичной способностью использованного в качестве положительного контроля антитела RG6058.

Пример 10. Терапевтический эффект 26B12H2L2 в отношении ксенотрансплантатов опухоли мышцей CT26 на трансгенных мышцах hTigit-BALB/c

Каждой из трансгенных мышцей hTigit-BALB/c (приобретенных в компании Gempharmatech Co., Ltd, у которых нормальный ген TIGIT мыши был заменен на ген TIGIT человека) инокулировали в спину 500 тысяч клеток CT26 (линия клеток рака толстой кишки мыши, приобретенная в ATCC). Конкретно, модель опухоли на мышцах была создана путем инокуляции каждой мышцей 100 мкл клеток CT26 с концентрацией 50 млн/мл. Подопытных мышцей разделили на следующие группы по 8 мышцей:

группа контроля изотипа G1, получавшая введения в дозе 20 мг/кг посредством

внутрибрюшинной (в.б.) инъекции два раза в неделю;

опытная группа G2, получавшая введения в дозе 4 мг/кг посредством внутрибрюшинной (в.б.) инъекции два раза в неделю;

опытная группа G3, получавшая введения в дозе 20 мг/кг посредством внутрибрюшинной (в.б.) инъекции два раза в неделю; и

группа положительного контроля G4, получавшая введения в дозе 20 мг/кг посредством внутрибрюшинной (в.б.) инъекции два раза в неделю.

Конкретная схема приведена в Таблице 9.

Таблица 9: Создание модели опухоли мышей СТ26 и схемы введения антител

Группа	Количество клеток	Количество животных	Моделирование	Схема введения
G1	500 тыс. клеток/мышь	8	Клетки СТ26: 50 млн клеток/мл	hIgG1 20 мг/кг, внутрибрюшинная (в.б.) инъекция, два раза в неделю
G2	500 тыс. клеток/мышь	8	Объем инокулята: 100 мкл/мышь	26B12H2L2 4 мг/кг, внутрибрюшинная (в.б.) инъекция, два раза в неделю
G3	500 тыс. клеток/мышь	8	Объем инокулята: 100 мкл/мышь	26B12H2L2 20 мг/кг, внутрибрюшинная (в.б.) инъекция, два раза в неделю
G4	500 тыс. клеток/мышь	8	Объем инокулята: 100 мкл/мышь	RG6058 20 мг/кг, внутрибрюшинная (в.б.) инъекция, два раза в неделю

Результаты эксперимента представлены на ФИГ. 18.

Результаты показывают, что 26B12H2L2 и RG6058 вызывали значительное уменьшение объема опухоли в модели опухоли СТ26 на трансгенных мышях hTIGIT-BALB/c по сравнению с контролем изотипа.

Результаты демонстрируют, что 26B12H2L2 обладает очень сильным лекарственным действием на трансгенных мышей hTIGIT-BALB/c в модели опухоли СТ26, и его эффект сравним с эффектом RG6058, соответственно, 26B12H2L2 имеет потенциал для лечения и/или предупреждения опухолей, в частности рака толстой кишки.

Вместе с тем, как показано на ФИГ. 19, 26B12H2L2 не влияло на массу тела трансгенных мышей hTIGIT-BALB/c в модели опухоли СТ26, что указывает на то, что

антитело 26В12Н2L2 не вызывало токсических побочных эффектов у мышей.

Несмотря на подробное описание конкретных воплощений настоящего изобретения специалистам в данной области техники будет понятно, что в этих деталях в соответствии со всеми раскрытыми принципами могут быть сделаны различные модификации и замены, и все эти изменения должны входить в объем охраны настоящего изобретения. Полный объем настоящего изобретения определяется прилагаемой формулой изобретения и любым ее эквивалентом.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело к TIGIT (Т-клеточный рецептор с доменами Ig (иммуноглобулиновый) и ITIM (иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий мотив)) или его антигенсвязывающий фрагмент, где

вариабельная область тяжелой цепи указанного антитела содержит HCDR1-HCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO: 3-5, соответственно, и вариабельная область легкой цепи указанного антитела содержит LCDR1-LCDR3 с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO: 8-10, соответственно.

2. Антитело к TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где вариабельная область тяжелой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 17; и

вариабельная область легкой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 25.

3. Антитело к TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1 или п. 2, где вариабельная область тяжелой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, и вариабельная область легкой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6;

вариабельная область тяжелой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, и вариабельная область легкой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19;

вариабельная область тяжелой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17, и вариабельная область легкой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19;

вариабельная область тяжелой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, и

вариабельная область легкой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21;

вариабельная область тяжелой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, и вариабельная область легкой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23;

вариабельная область тяжелой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15, и вариабельная область легкой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21;

вариабельная область тяжелой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15, и вариабельная область легкой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23;

вариабельная область тяжелой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, и вариабельная область легкой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25; или

вариабельная область тяжелой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17, и вариабельная область легкой цепи указанного антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25.

4. Антитело к TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-3, где указанные антитело к TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb, фрагмента области, определяющей комплементарность, одноцепочечного антитела, гуманизированного антитела, химерного антитела и диатела.

5. Антитело к TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-4, где

указанное антитело содержит отличную от CDR (область, определяющая комплементарность) область, имеющую происхождение из вида, отличного от

мышинных, например антитела человека.

6. Антитело к TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-5, где константная область тяжелой цепи указанного антитела представляет собой С-область цепи гамма-1 Ig (иммуноглобулина) (например, под номером доступа в базе NCBI: P01857) или С-область цепи гамма-4 Ig (например, под номером доступа в базе NCBI: P01861.1); константная область легкой цепи указанного антитела представляет собой С-область цепи каппа Ig (например, под номером доступа в базе NCBI: P01834).

7. Антитело к TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-6, где указанное антитело связывается с TIGIT-mFc с K_D , составляющей менее $4E-10$ или менее $4E-11$; предпочтительно K_D определяют с помощью прибора для анализа молекулярных взаимодействий от компании Fortebio.

8. Антитело к TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-7, где указанное антитело связывается с TIGIT-mFc с EC_{50} , составляющей менее $1,5$ нМ, менее $1,2$ нМ или менее 1 нМ; предпочтительно EC_{50} определяют с помощью проточного цитометра.

9. Антитело к TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-8, где указанное антитело к TIGIT представляет собой антитело, продуцируемое линией клеток гибридомы LT019, депонированной в Китайском центре коллекции типовых культур (ССТСС) под номером ССТСС С2020208.

10. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело к TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-9.

11. Вектор, содержащий выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по п. 10.

12. Клетка-хозяин, содержащая выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по п. 10 или вектор по п. 11.

13. Линия клеток гибридомы LT019, депонированная в Китайском центре коллекции типовых культур (ССТСС) под номером ССТСС С2020208.

14. Конъюгат, содержащий антитело и конъюгированную группировку, где антитело представляет собой антитело к TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-9, и конъюгированная группировка представляет собой детектируемую метку; предпочтительно конъюгированная группировка представляет собой радиоизотоп, флуоресцентное вещество, люминесцентное вещество, окрашенное

вещество или фермент.

15. Набор, содержащий антитело к TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-9 или конъюгат по п. 14;

где предпочтительно указанный набор дополнительно содержит вторичное антитело, специфично распознающее указанное антитело; возможно, вторичное антитело дополнительно содержит детектируемую метку, например радиоизотоп, флуоресцентное вещество, люминесцентное вещество, окрашенное вещество или фермент.

16. Применение антитела по любому из пп. 1-9 или конъюгата по п. 14 в получении набора для определения присутствия или уровня TIGIT в образце.

17. Биспецифическое антитело, содержащее первую функциональную область белка и вторую функциональную область белка, где

первая функциональная область белка нацелена на TIGIT;

вторая функциональная область белка нацелена на отличную от TIGIT мишень (например, PD-1 (белок программируемой смерти 1));

где первая функциональная область белка представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-9;

предпочтительно биспецифическое антитело имеет формат IgG-scFv;

предпочтительно первая функциональная область белка представляет собой антитело по любому из пп. 1-9 и находится в форме иммуноглобулина, и вторая функциональная область белка представляет собой одноцепочечное антитело; или

предпочтительно первая функциональная область белка представляет собой одноцепочечное антитело, и вторая функциональная область белка представляет собой антитело в форме иммуноглобулина, нацеленное на отличную от TIGIT мишень (например, PD-1).

18. Биспецифическое антитело по п. 17, где указанные первая функциональная область белка и вторая функциональная область белка связаны непосредственно или через линкерный фрагмент.

19. Биспецифическое антитело по п. 17 или п. 18, где число каждой из указанных первой функциональной области белка и второй функциональной области белка независимо равно 1, 2 или больше.

20. Биспецифическое антитело по любому из пп. 17-19, где указанное одноцепочечное антитело связано с С-концами двух тяжелых цепей указанного антитела в форме иммуноглобулина.

21. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело к TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-9 или конъюгат по п. 14, где возможно указанная фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель и/или эксципиент.

22. Фармацевтическая композиция по п. 21, дополнительно содержащая одно или более антител к PD-1 или одно или более антител к PD-L1 (лиганд PD-1).

23. Фармацевтическая композиция по п. 21 или п. 22, где массовое отношение антитела к TIGIT или его антигенсвязывающего фрагмента к антителу к PD-1 или антителу к PD-L1 составляет (1:5)-(5:1) из расчета на массу антител.

24. Комбинированный продукт, содержащий первый продукт и второй продукт в отдельных упаковках, где

первый продукт содержит антитело к TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-9, конъюгат по п. 14 или фармацевтическую композицию по любому из пп. 21-23;

второй продукт содержит по меньшей мере одно антитело к PD-1 или по меньшей мере одно антитело к PD-L1;

предпочтительно указанные первый продукт и второй продукт дополнительно независимо содержат один или более фармацевтически приемлемых адъювантов;

предпочтительно комбинированный продукт дополнительно содержит листовку-вкладыш в упаковке.

25. Комбинированный продукт по п. 24, где массовое отношение антитела к TIGIT или его антигенсвязывающего фрагмента к антителу к PD-1 или антителу к PD-L1 составляет (1:5)-(5:1) из расчета на массу антител.

26. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-9, конъюгата по п. 14, биспецифического антитела по любому из пп. 17-20 или фармацевтической композиции по любому из пп. 21-23 в получении лекарственного средства для лечения и/или предупреждения опухоли, где

предпочтительно опухоль выбрана из одного или более из рака печени, рака

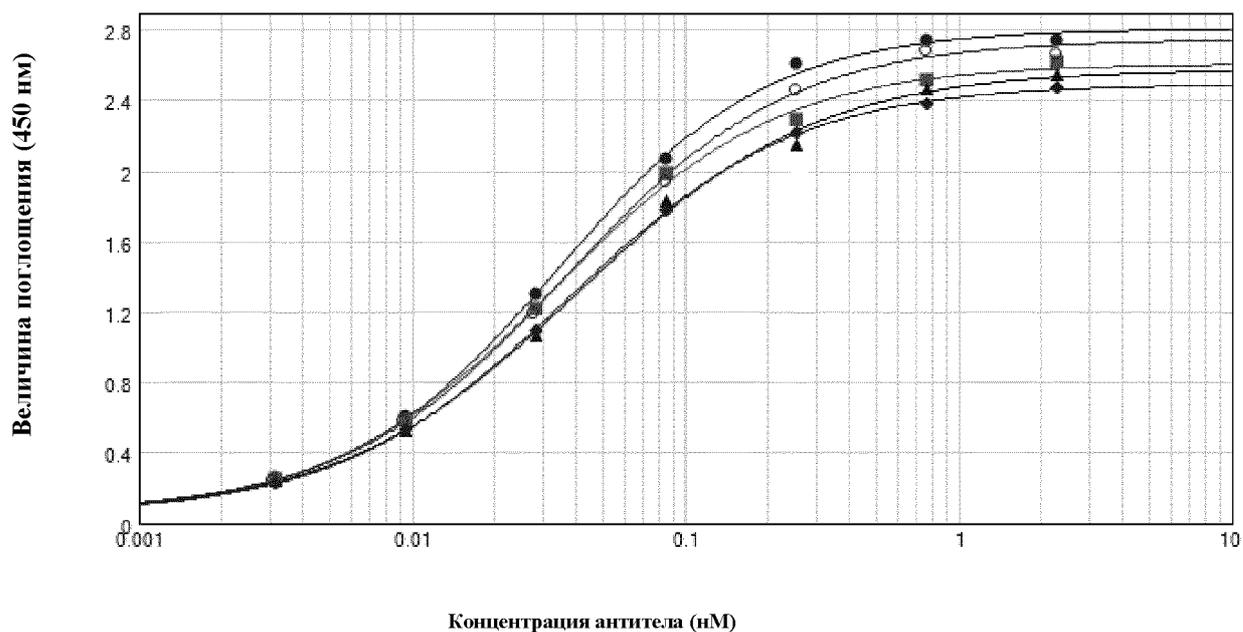
почки, опухоли головного мозга, уротелиальной карциномы, опухоли кости, холангиокарциномы, немелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, рака молочной железы, рака яичника, колоректального рака, меланомы, рака поджелудочной железы, опухоли шейки матки, множественной миеломы, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, В-лимфомы, рака плазматических клеток, рака эндометрия, рака предстательной железы и рака яичка.

27. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-9 или биспецифическое антитело по любому из пп. 17-20 для применения в лечении и/или предупреждении опухоли, где

предпочтительно опухоль выбрана из одного или более из рака печени, рака почки, опухоли головного мозга, уротелиальной карциномы, опухоли кости, холангиокарциномы, немелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, рака молочной железы, рака яичника, колоректального рака, меланомы, рака поджелудочной железы, опухоли шейки матки, множественной миеломы, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, В-лимфомы, рака яичника, рака плазматических клеток, рака эндометрия, рака предстательной железы и рака яичка.

28. Способ лечения и/или предупреждения опухоли, включающий стадию введения нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-9 или биспецифического антитела по любому из пп. 17-20, где

предпочтительно опухоль выбрана из одного или более из рака печени, рака почки, опухоли головного мозга, уротелиальной карциномы, опухоли кости, холангиокарциномы, немелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, рака молочной железы, рака яичника, колоректального рака, меланомы, рака поджелудочной железы, опухоли шейки матки, множественной миеломы, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, В-лимфомы, рака яичника, рака плазматических клеток, рака эндометрия, рака предстательной железы и рака яичка.



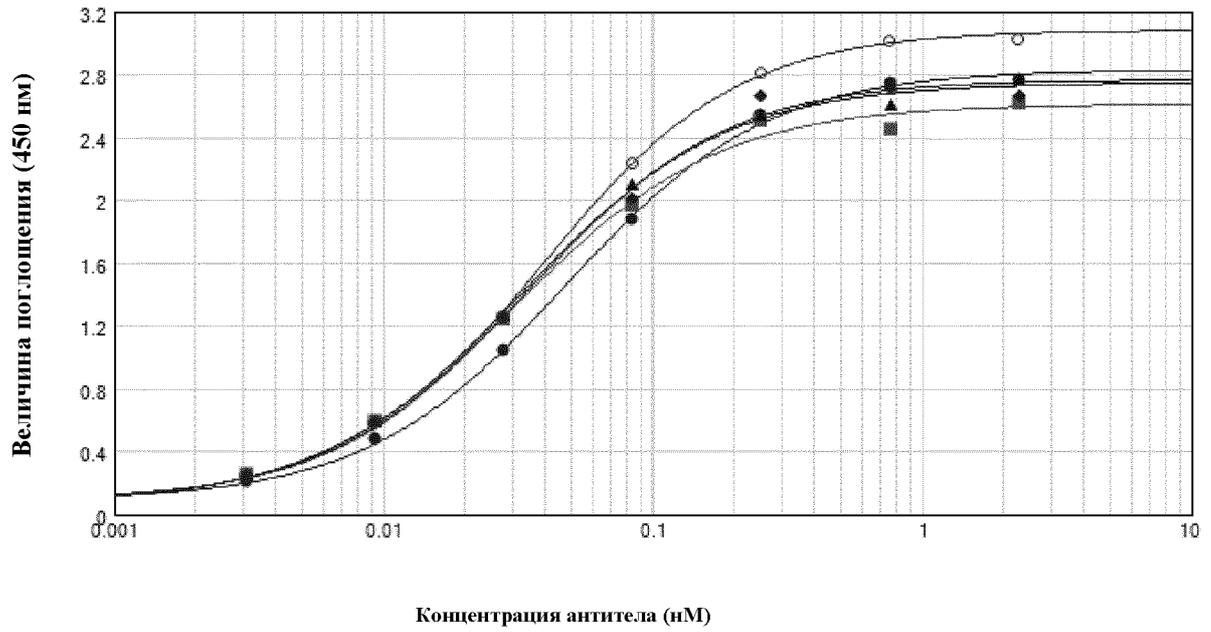
Аппроксимирующая кривая:

$$y = D + \frac{A - D}{1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B}$$

4-параметрическая

26B12H1L1	26B12H2L2	26B12H2L3	26B12H3L2	RG6058
$R^2 = 0.999$	$R^2 = 0.999$	$R^2 = 0.998$	$R^2 = 1.000$	$R^2 = 0.999$
EC50 = 0.034	EC50 = 0.033	EC50 = 0.040	EC50 = 0.037	EC50 = 0.036

ФИГ. 1



- 26B12H3L3
- 26B12H1L4
- ▲ 26B12H4L1
- ◆ 26B12H4L4
- RG6058

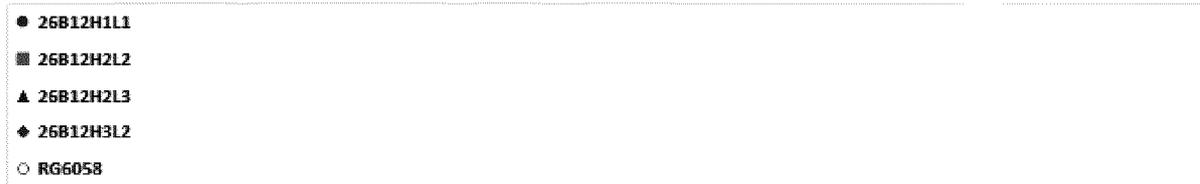
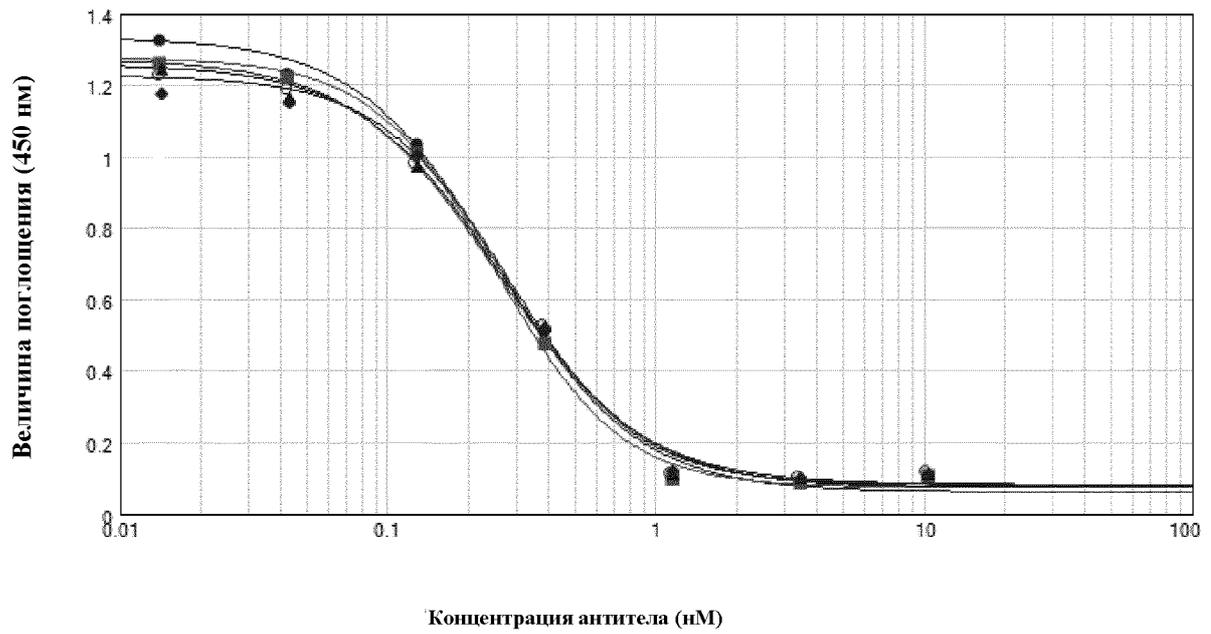
Аппроксимирующая кривая:

$$y = D + \frac{A - D}{1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B}$$

4-параметрическая

26B12H3L3	26B12H1L4	26B12H4L1	26B12H4L4	RG6058
$R^2 = 0.999$	$R^2 = 0.997$	$R^2 = 0.999$	$R^2 = 0.997$	$R^2 = 1.000$
EC50 = 0.048	EC50 = 0.031	EC50 = 0.033	EC50 = 0.034	EC50 = 0.039

ФИГ. 2



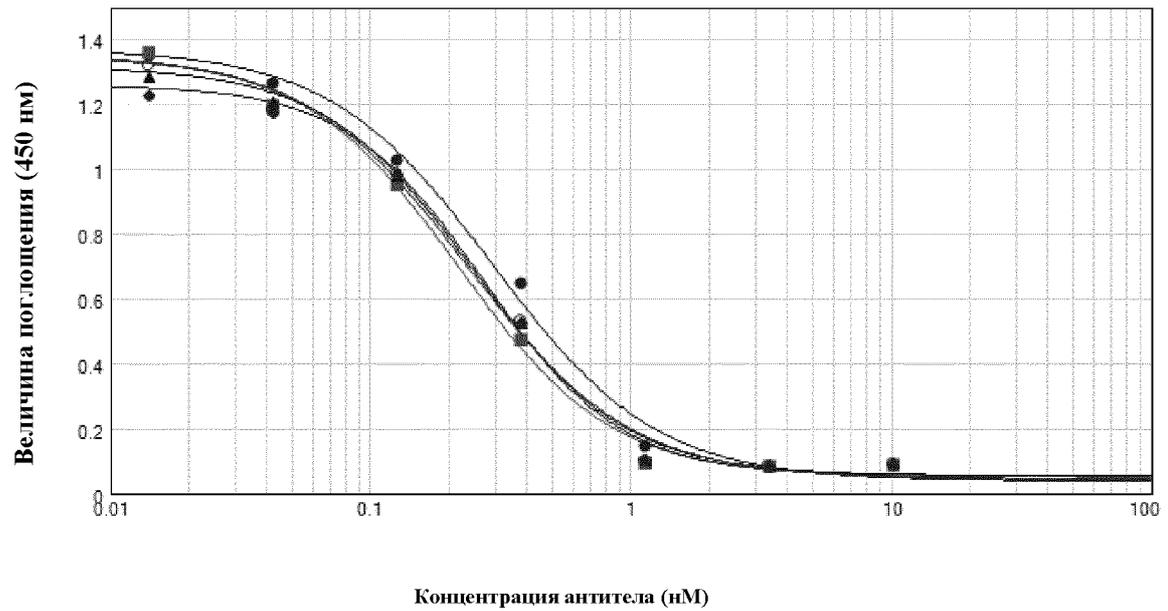
Аппроксимирующая кривая:

$$y = D + \frac{A - D}{1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B}$$

4-параметрическая

26B12H1L1	26B12H2L2	26B12H2L3	26B12H3L2	RG6058
$R^2 = 0.997$	$R^2 = 0.998$	$R^2 = 0.996$	$R^2 = 0.994$	$R^2 = 0.995$
EC50 = 0.255	EC50 = 0.254	EC50 = 0.266	EC50 = 0.283	EC50 = 0.254

ФИГ. 3



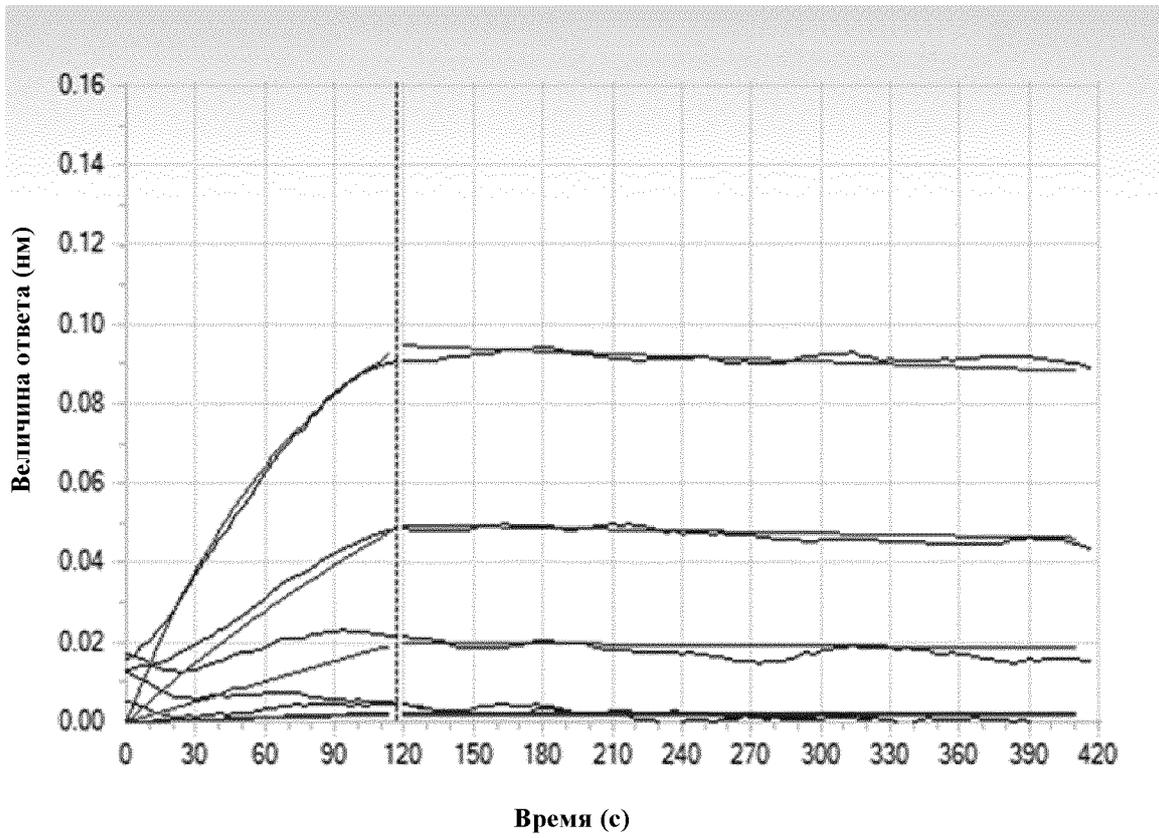
Аппроксимирующая кривая:

4-параметрическая

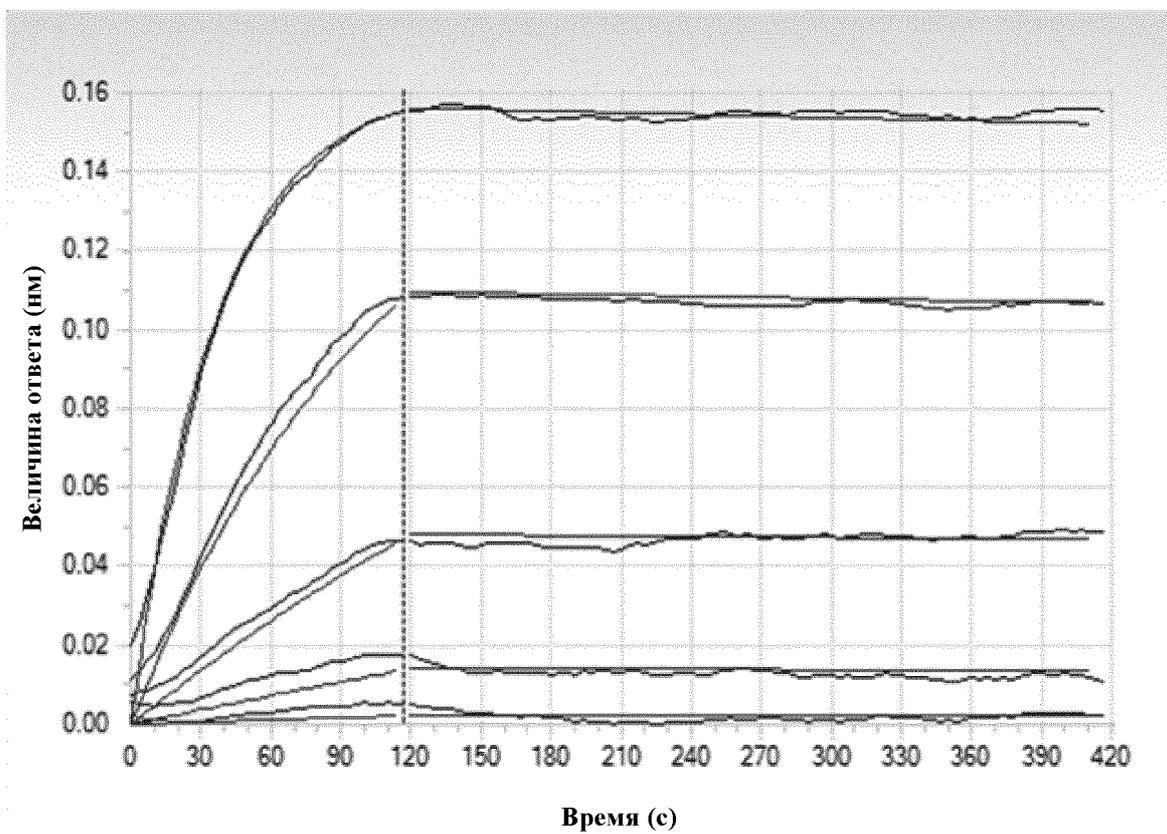
$$y = D + \frac{A - D}{1 + \left(\frac{x}{C}\right)^5}$$

26B12H3L3	26B12H1L4	26B12H4L1	26B12H4L4	RG6058
$R^2 = 0.995$	$R^2 = 0.996$	$R^2 = 0.996$	$R^2 = 0.996$	$R^2 = 0.993$
EC50 = 0.294	EC50 = 0.217	EC50 = 0.250	EC50 = 0.271	EC50 = 0.236

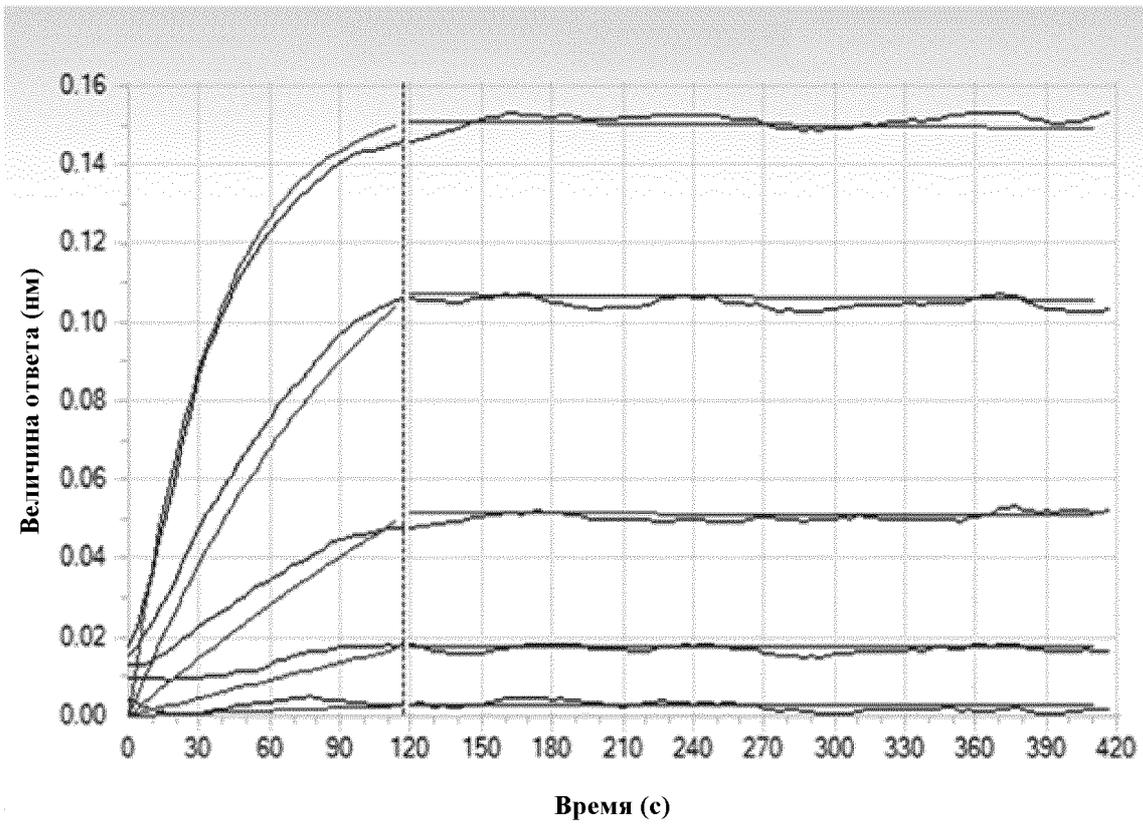
ФИГ. 4



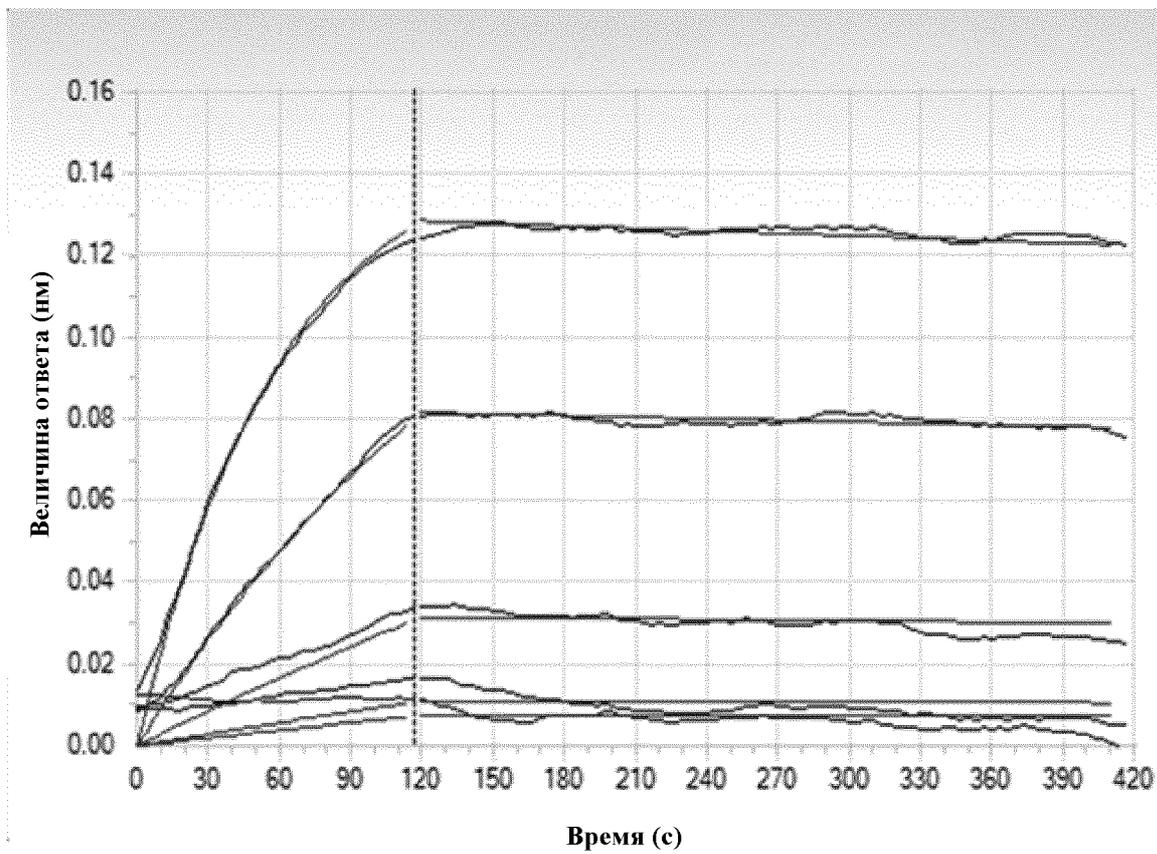
ФИГ. 5



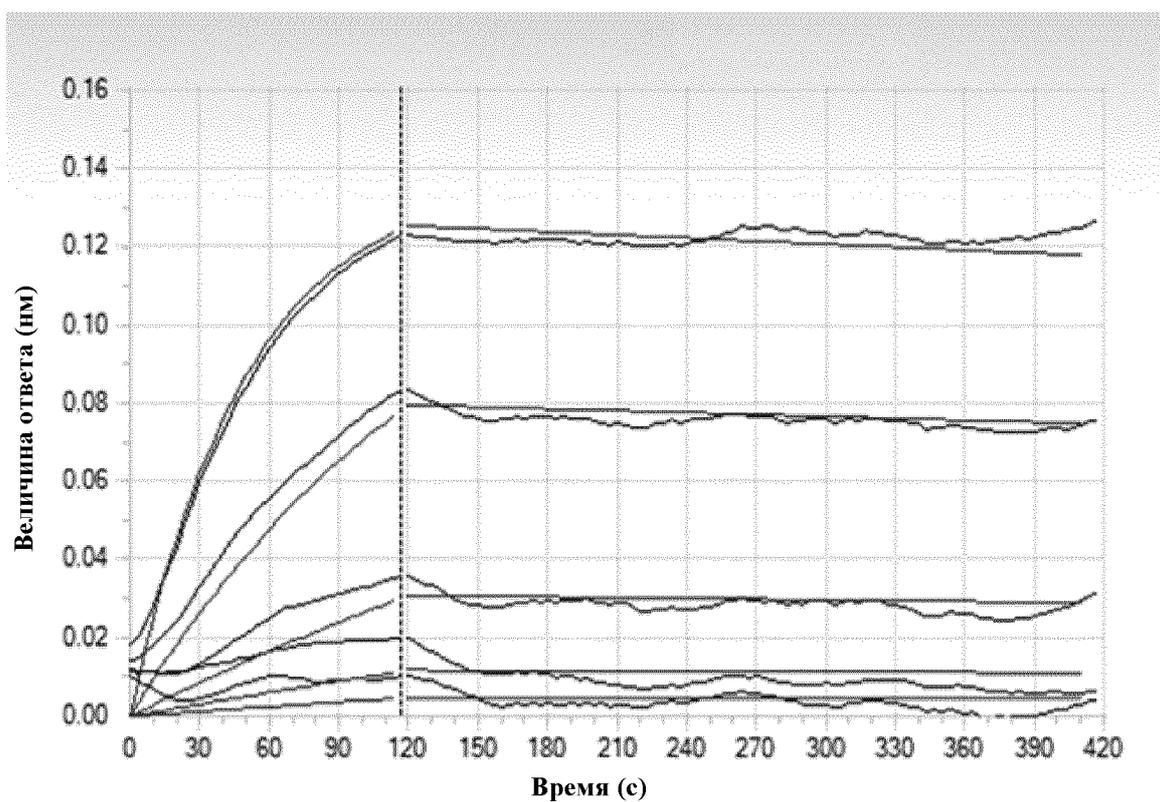
ФИГ. 6



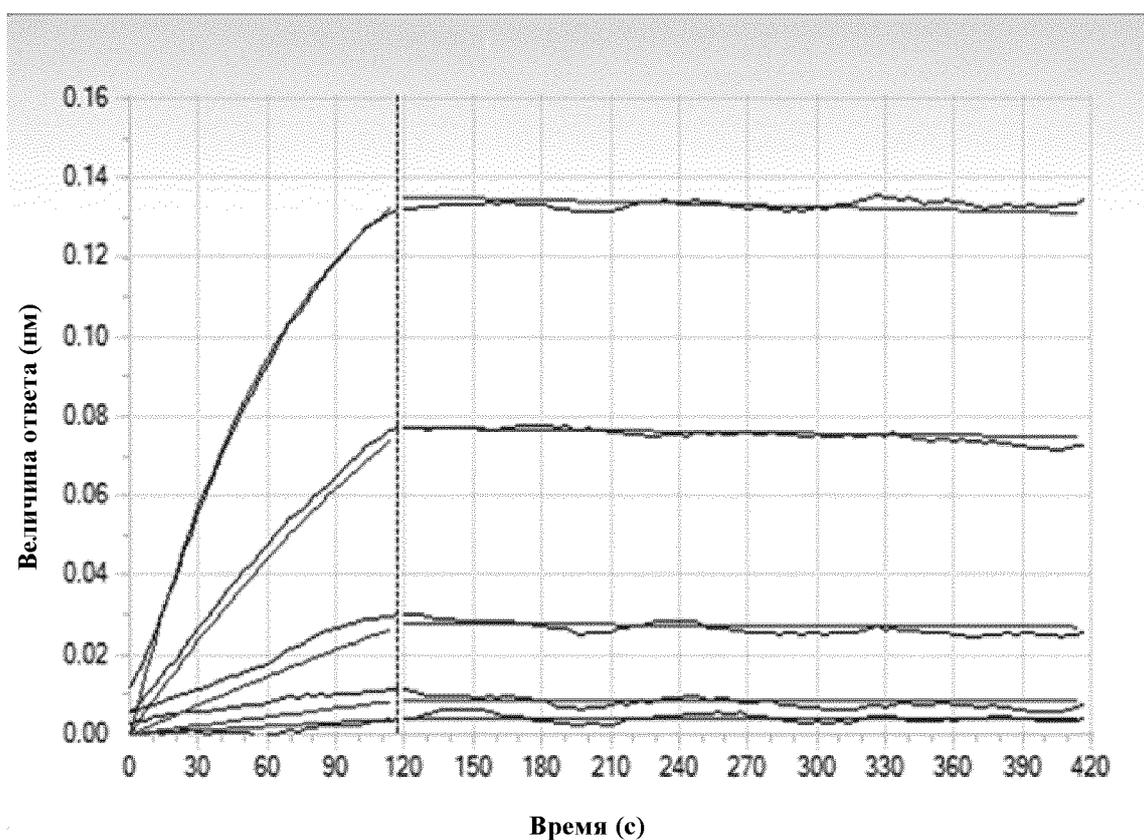
ФИГ. 7



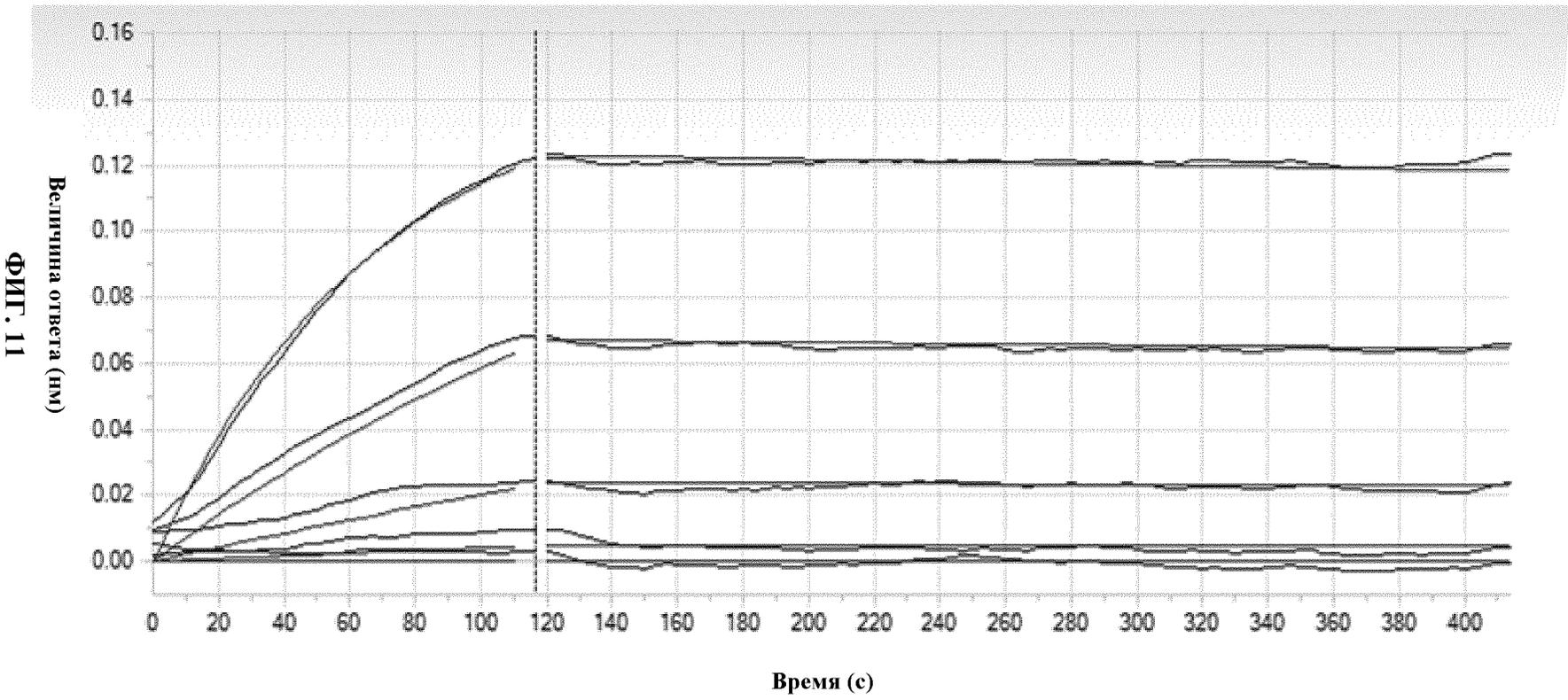
ФИГ. 8

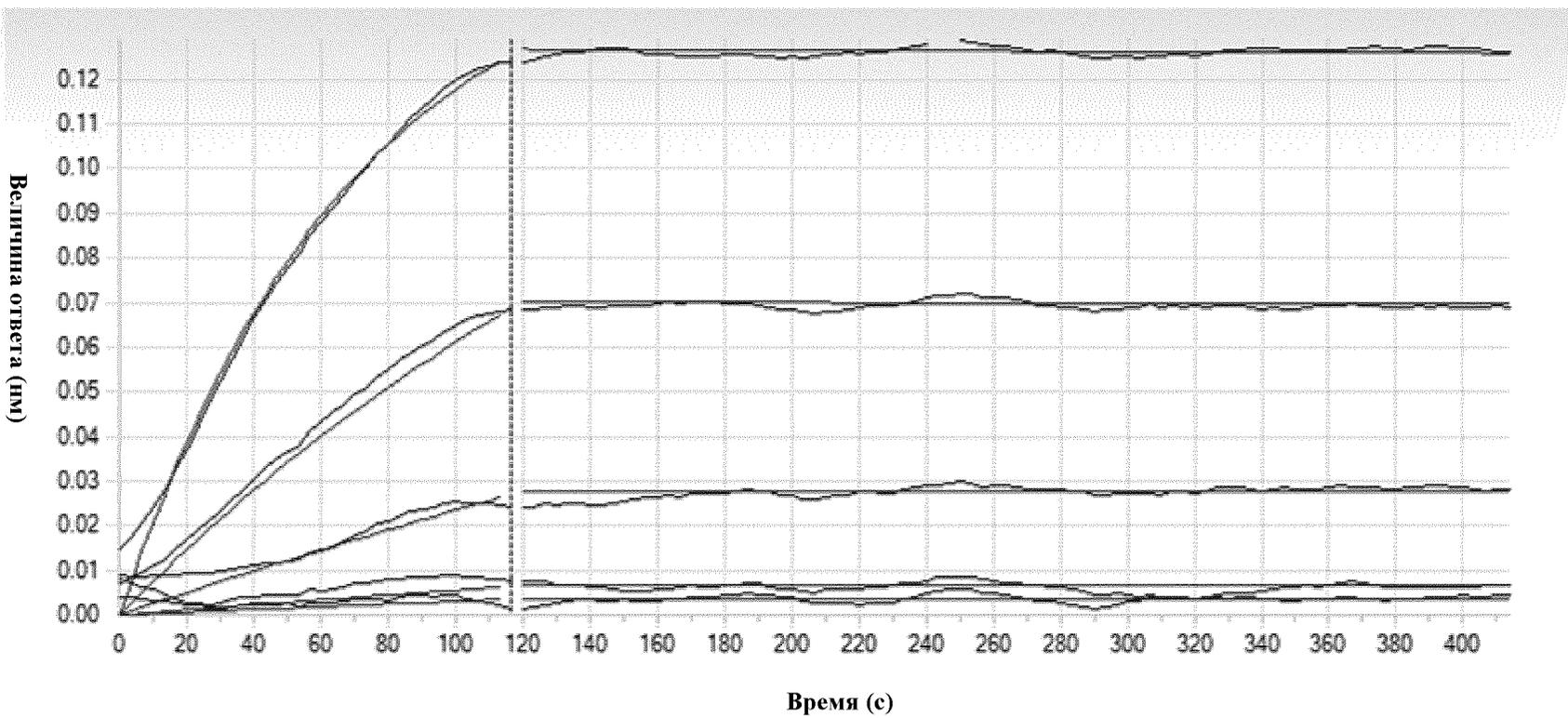


ФИГ. 9

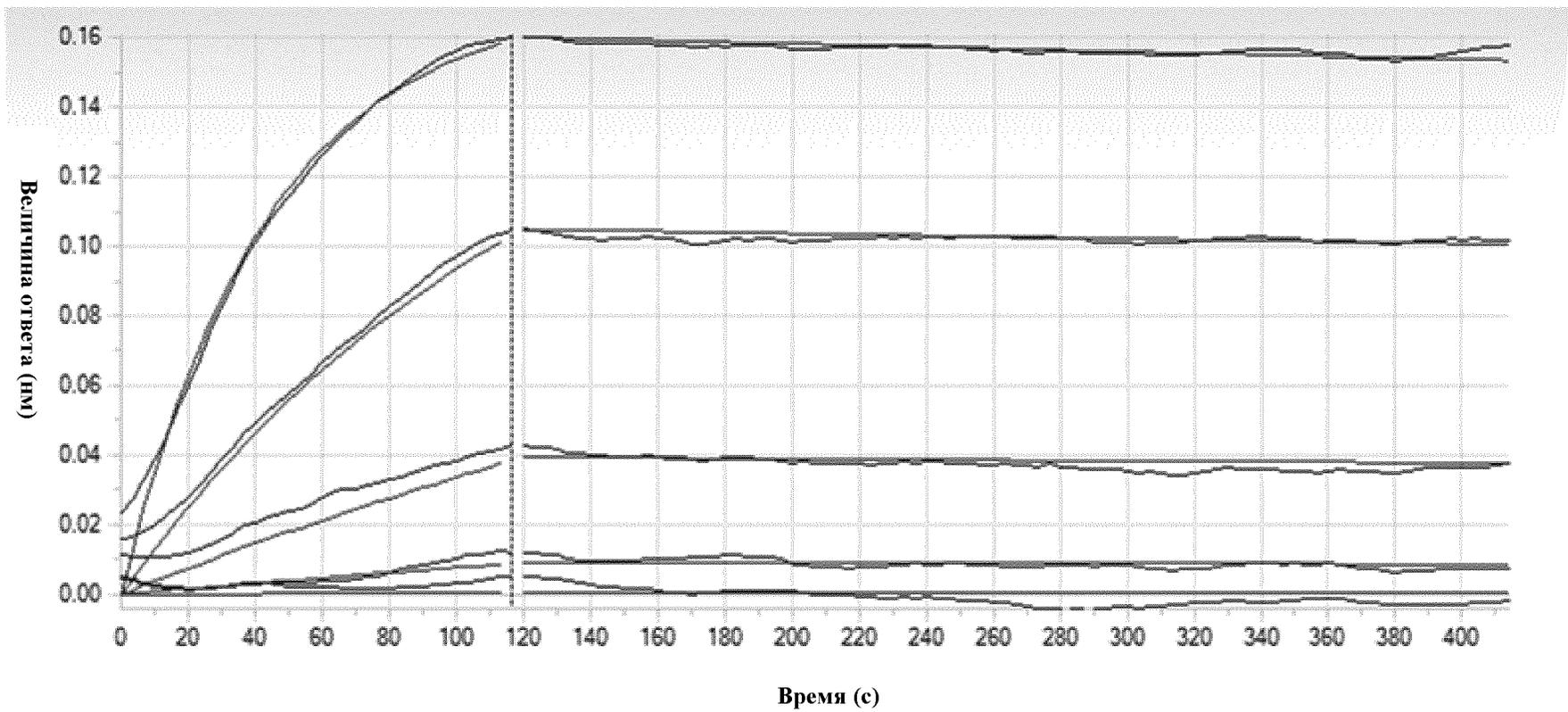


ФИГ. 10

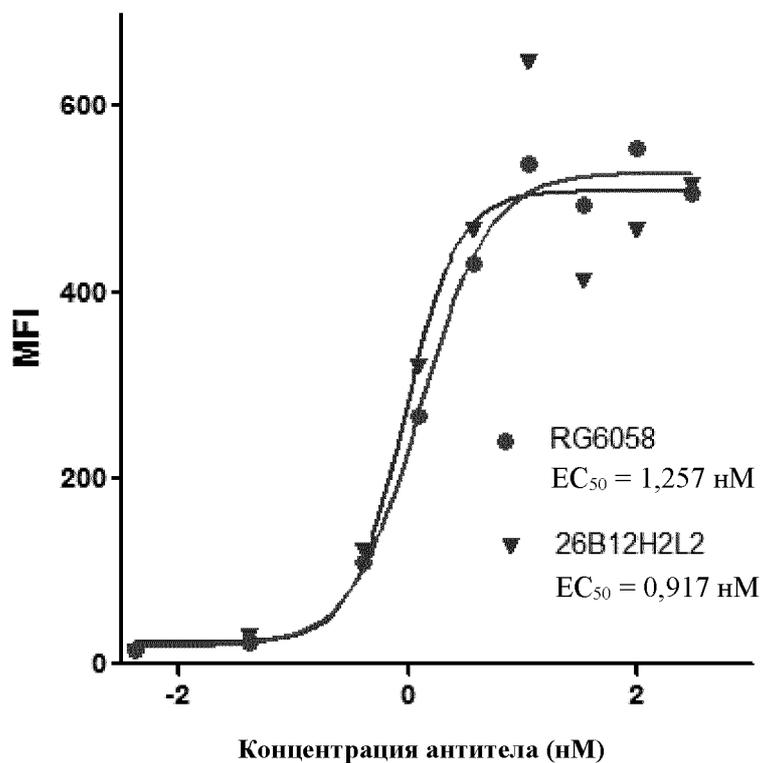




ФИГ. 12

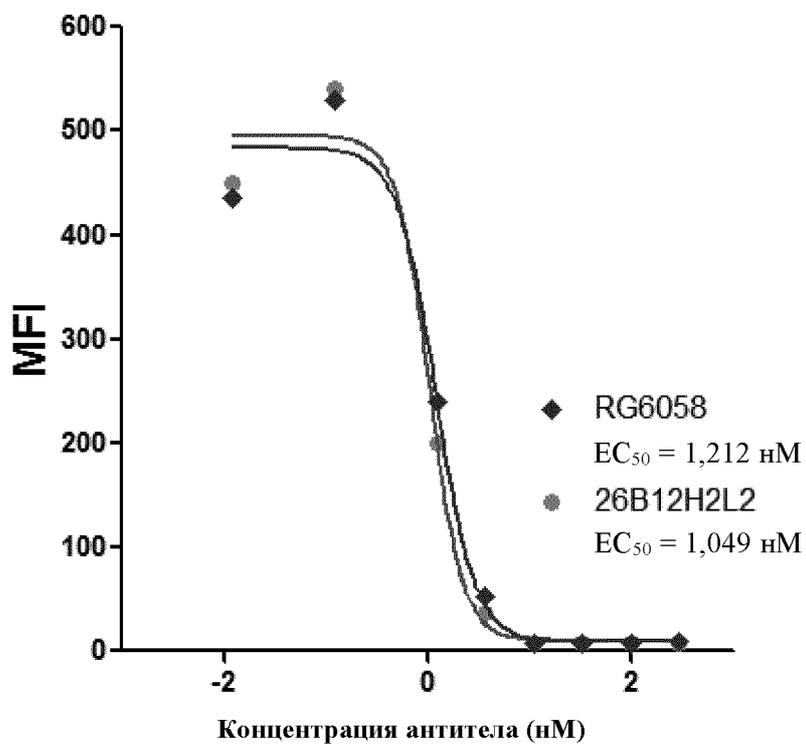


ФИГ. 13

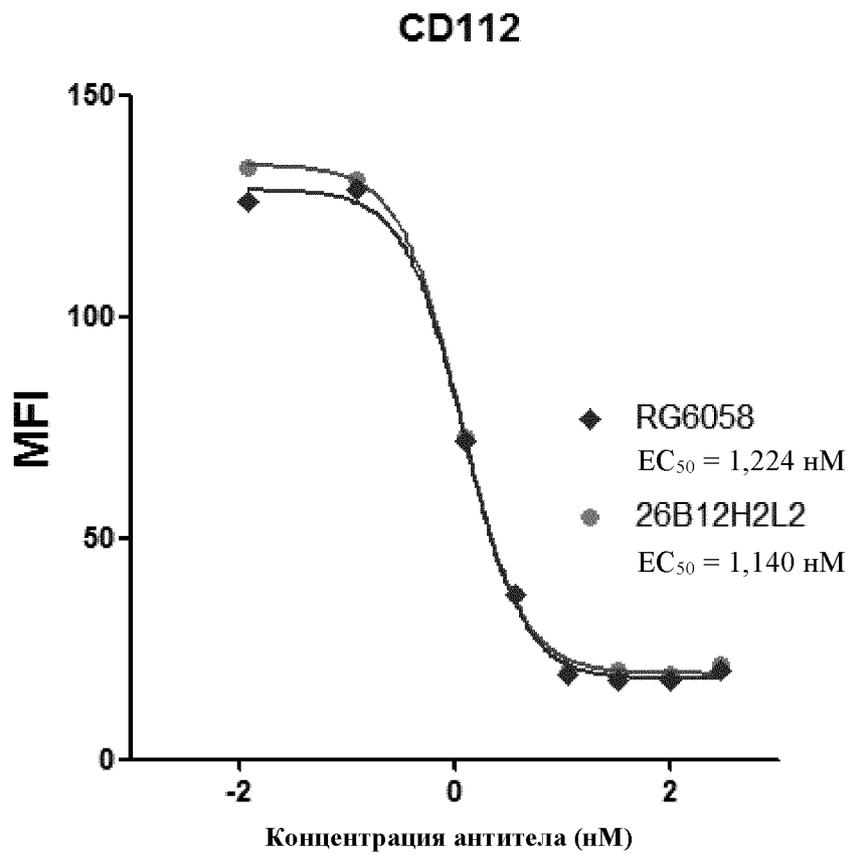


ФИГ. 14

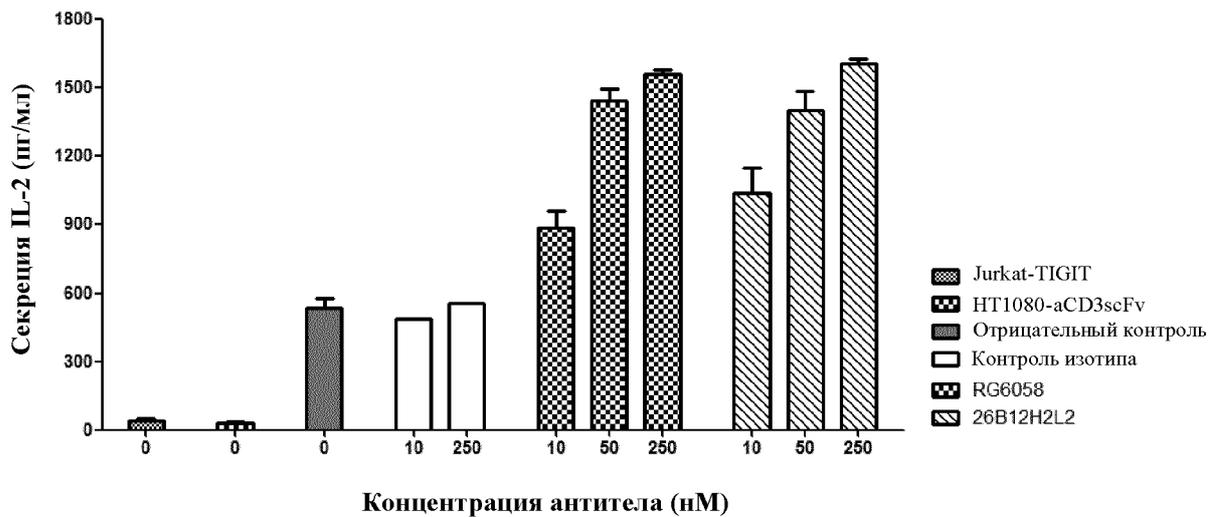
CD155



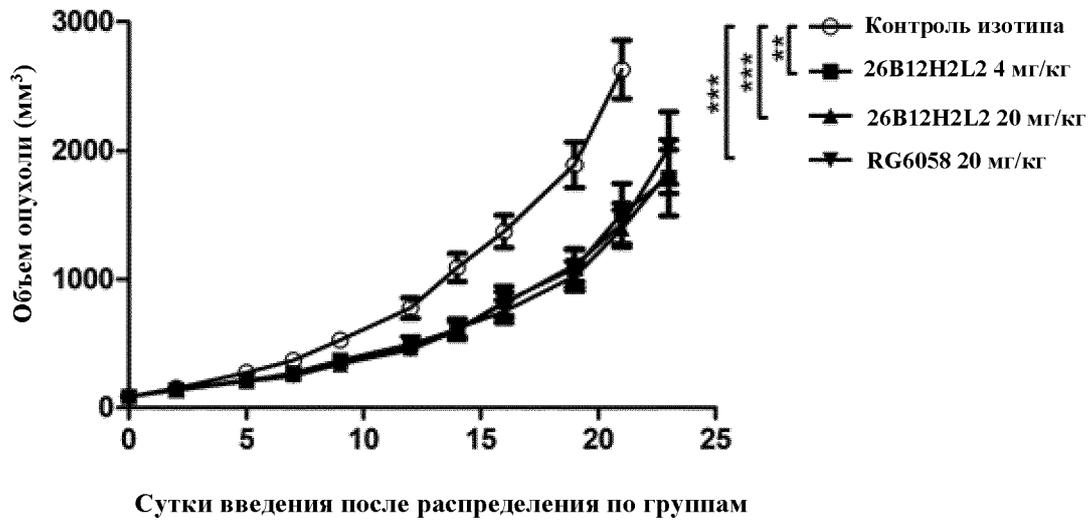
ФИГ. 15



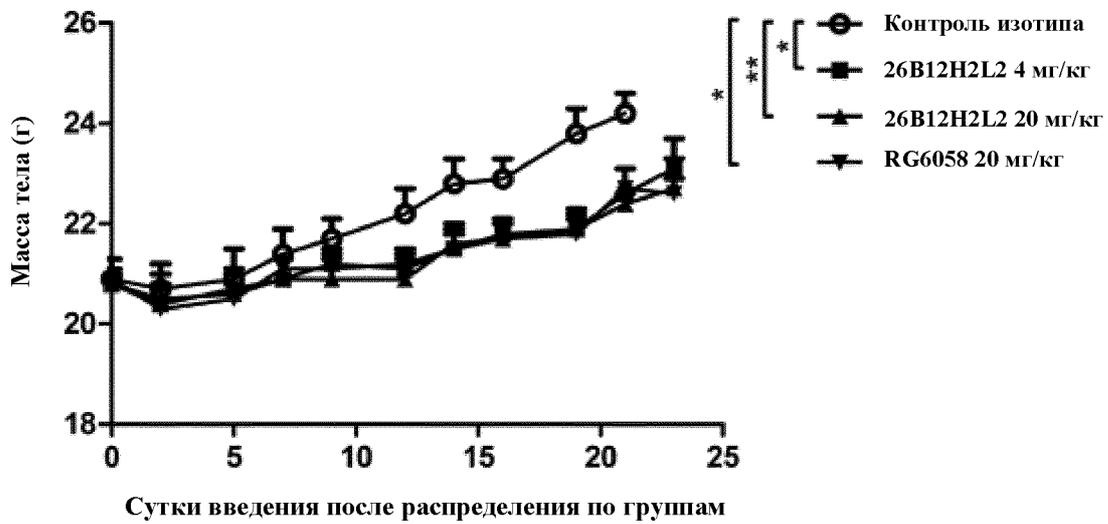
ФИГ. 16



ФИГ. 17



ФИГ. 18



ФИГ. 19