

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202392462** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.12.20

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

(22) Дата подачи заявки
2022.04.29

(54) **БИСПЕЦИФИЧЕСКИ СВЯЗЫВАЮЩИЕСЯ С PD-1 И TIGIT БЕЛКИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) 63/182,156

(32) 2021.04.30

(33) US

(86) PCT/IB2022/053997

(87) WO 2022/229919 2022.11.03

(88) 2023.01.05

(71) Заявитель:
МЕДИМЬОН, ЭлЭлСи (US)

(72) Изобретатель:

Мазор Ярив, Ван Юэ, Муди Гордон,
Мальхотра Дипали, Оверстрит
Майкл, Клэнси-Томпсон Элеонор, Ли
Карин, Приц Стейси, Хаммонд Скотт
(US)

(74) Представитель:

Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Черкас Д.А., Игнатьев А.В., Путинцев
А.И., Билык А.В., Дмитриев А.В. (RU)

(57) Описание относится к связывающимся белкам, включая антитела, которые связываются с белками программируемой гибели-1 (PD-1) и Т-клеточным иммунорецептором с Ig- и ITIM-доменами (TIGIT). Описание также относится к композициям, содержащим указанные связывающиеся белки, и молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим указанные связывающиеся белки. Описание дополнительно относится к способам лечения расстройства или состояния с использованием указанных связывающихся белков.

202392462

A1

A1

202392462

БИСПЕЦИФИЧЕСКИ СВЯЗЫВАЮЩИЕСЯ С PD-1 И TIGIT БЕЛКИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА СМЕЖНЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] В настоящей заявке испрашивается приоритет по заявке США № 63/182,156, поданной 30 апреля 2021 г., содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

ВКЛЮЧЕНИЕ МАТЕРИАЛОВ, ПРЕДСТАВЛЕННЫХ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ, ПУТЕМ ССЫЛКИ

[0002] В настоящий документ в полном объеме путем ссылки включен машиночитаемый перечень нуклеотидных/аминокислотных последовательностей, представленный одновременно с настоящим документом и определяемый следующим образом: Один файл ASCII (текстовый) размером 28 168 байт с именем TIGIT-101-WO-PCT_SL_ST25.TXT, созданный 26 апреля 2022 г.

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ОПИСАНИЯ

[0003] Описание относится к связывающимся белкам, включая антитела, которые специфически связываются с белком программируемой гибели-1 (PD-1) и Т-клеточным иммунорецептором с доменами Ig и ITIM (TIGIT). Описание также относится к композициям, содержащим указанные связывающиеся белки, и молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим указанные связывающиеся белки. Описание дополнительно относится к способам лечения расстройства или состояния с использованием указанных связывающихся белков.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] Белок программируемой гибели-1 (PD-1) представляет собой мембранный белок типа I массой приблизительно 31 кДа, который является членом расширенного семейства CD28/CTLA4 регуляторов Т-клеток (см. Ishida *et al.*, "Induced Expression

of PD-1, A Novel Member of the Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death," *EMBO J.* 11: 3887-95 (1992)). PD-1 экспрессируется на активированных Т-клетках, В-клетках и моноцитах, а также в небольших количествах в натуральных киллерных (NK) Т-клетках. PD-1 является хорошо зарекомендовавшей себя мишенью для иммуноопосредованной терапии онкологических заболеваний. При антагонистическом ингибировании взаимодействия PD-1/PD-L1 повышается активация Т-клеток, усиливая распознавание и устранение опухолевых клеток иммунной системой хозяина.

[0005] TIGIT (также известный как Т-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и ITIM) представляет собой иммунный рецептор, присутствующий на некоторых Т-клетках и натуральных киллерных клетках (NK). Экспрессия TIGIT усиливается в иммунных клетках, включая активированные Т-клетки, натуральные киллерные клетки и регуляторные Т-клетки.

ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0006] В настоящем документе предложен биспецифически связывающийся белок, который специфически связывается с PD-1 и TIGIT, содержащий: а) первый связывающийся домен, который специфически связывается с PD-1, причем первый связывающийся домен содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и переменный домен легкой цепи, содержащий LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; и б) второй связывающийся домен, который специфически связывается с TIGIT, причем второй связывающийся домен содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и HCDR3, имеющую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

[0007] В настоящем документе также предложен способ лечения субъекта, имеющего опухоль, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества биспецифически связывающихся белков, описанных в настоящем документе. В настоящем документе также предложен способ лечения или профилактики рака у субъекта, включающий введение биспецифически связывающихся белков, описанных в настоящем документе.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0008] На ФИГ. 1 показан анализ последовательности остатков, идентифицированных в вариабельной области тяжелой цепи родительского VAR1.

[0009] На ФИГ. 2 показан анализ последовательности остатков, идентифицированных в вариабельной области легкой цепи родительского VAR1.

[0010] На ФИГ. 3А и 3В показано выравнивание вариабельной области тяжелой цепи родительского VAR1 с последовательностью зародышевой линии. Области CDR на ФИГ. 3А выделены в соответствии с системой нумерации Чотиа. Области CDR на ФИГ. 3В, выделены согласно системе нумерации IMGT. Выравнивание показывает, что родительский VAR1 содержал четыре аминокислоты в сегменте FR1, которые не были остатками зародышевой линии и не были остатками Вернье.

[0011] На ФИГ. 4А и 4В показано выравнивание вариабельной области легкой цепи родительского VAR1 с последовательностью зародышевой линии. Выравнивание показывает, что VL родительского VAR1 имела десять аминокислот, которые не были аминокислотами зародышевой линии, остаток Вернье Q (Q-K) в сегменте FR3, остаток упаковки цепи F (F-Y) перед CDRL3 и остаток упаковки цепи L (L-F) после CDRL3.

[0012] На ФИГ. 5 показано, что варианты VAR1 поддерживали эффективность свойств экспрессии и соединения.

[0013] На ФИГ. 6А и 6В показано, что варианты VAR1 сохранили свойства клеточного связывания родительских mAb (моноклональных антител) с TIGIT OE 293 человека и яванского макака. Данные отображают медианную интенсивность флуоресценции (MFI).

[0014] На ФИГ. 7 показаны характеристики и формат конкретных аспектов описанных в настоящем документе связывающихся белков.

[0015] ФИГ. 8А–8В. На ФИГ. 8А показано одновременное связывание с использованием формата захвата антигена. Сенсоры, нагруженные антигеном к человеческому TIGIT, подвергали последовательным взаимодействиям, характеризующимся ассоциацией и диссоциацией, сначала с AZD2936, впоследствии с человеческим PD-1. Ассоц.: ассоциация; диссоц.: диссоциация; SA: стрептавидин. На ФИГ. 8В показано одновременное связывание с использованием формата захвата антигена. Сенсоры, нагруженные антигеном к человеческому PD-1, подвергали последовательным взаимодействиям, характеризующимся ассоциацией и диссоциацией, сначала с AZD2936, впоследствии с человеческим TIGIT. Ассоц.: ассоциация; диссоц.: диссоциация; Ni-NTA: никель-нитрилотриуксусная кислота.

[0016] На ФИГ. 9А–9С показано, что AZD2936 продемонстрировал активность связывания PD-1 и TIGIT по сравнению с моноспецифическими антителами. На ФИГ. 9А показано опосредованное AZD2936 клеточное связывание с рецепторами человеческого TIGIT на сконструированных клетках Jurkat PD-1⁻TIGIT⁺. На ФИГ. 9В показано опосредованное AZD2936 клеточное связывание с рецепторами PD-1 человека на сконструированных клетках Jurkat PD-1⁻TIGIT⁺. На ФИГ. 9С показано опосредованное AZD2936 клеточное связывание с рецепторами PD-1 и TIGIT человека на клетках Jurkat PD-1⁻TIGIT⁺, Jurkat PD-1⁺TIGIT⁻ или клетках с двойной экспрессией Jurkat PD-1⁺TIGIT⁺. MFI = средняя геометрическая интенсивность флуоресценции; PD-1 = белок запрограммированной клеточной смерти 1; TIGIT = T-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и

иммунорецепторного ингибирующего мотива на основе тирозина. Клеточное связывание с человеческими клеточными линиями с единичной экспрессией: Jurkat PD-1⁺TIGIT⁺ и Jurkat PD-1⁺ TIGIT⁻ или с человеческими клетками с двойной экспрессией Jurkat PD-1⁺ TIGIT⁺. Тестируемые и контрольные антитела обнаруживали с помощью конъюгированных с флуоресцентным красителем козьих вторичных антител к человеческим IgG и оценивали посредством проточной цитометрии.

[0017] На ФИГ. 10А–10С показано, что по сравнению с моноспецифическими антителами у AZD2936 обнаружена активность по блокированию лигандов PD-1 и TIGIT с усилением TCR-опосредованной передачи сигналов, что было определено с использованием репортерного анализа клеток Jurkat. На ФИГ. 10А показана биологическая активность AZD2936 и антитела к PD-1, определенная в репортерных NFAT-люциферазных анализах при сокультивировании двух типов клеточных линий с использованием человеческих PD-1⁺ TIGIT⁻ Т-клеток Jurkat. На ФИГ. 10В показана биологическая активность AZD2936, определенная в репортерных NFAT-люциферазных анализах при сокультивировании двух типов клеточных линий с использованием человеческих PD-1⁻TIGIT⁻ Т-клеток Jurkat. На ФИГ. 10С показана биологическая активность AZD2936, определенная в репортерных NFAT-люциферазных анализах при сокультивировании двух типов клеточных линий с использованием человеческих PD-1⁺TIGIT⁺ Т-клеток Jurkat. CD155 — кластер дифференцировки 155; CHO — яичник китайского хомячка; NFAT — ядерный фактор активированных Т-клеток; PD-1 — белок запрограммированной клеточной смерти 1; RLU — относительная световая единица; Ст. откл. — стандартное отклонение; TCR — Т-клеточный рецептор; TIGIT — Т-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и иммунорецепторного ингибирующего мотива на основе тирозина.

[0018] На ФИГ. 11А–11D показана клеточная киллерная активность AZD2936 и стимуляция высвобождения IFN- γ в анализе клеточного киллинга, как описано в примере 4. На ФИГ. 11А показаны данные по РВМС (моноклеарным клеткам периферической крови) от пяти доноров. На ФИГ. 11В показано кратное увеличение

высвобождаемого человеческого IFN- γ по результатам анализа сокультивирования Т-клеток и человеческих опухолевых клеток в ответ на AZD2936 и другие антитела. На ФИГ. 11С показано титрование для определения концентрации антител от 10 нМ до 0,1 пМ. На ФИГ. 11D показано среднее арифметическое значение EC50 цитотоксичности для AZD2936 ($n = 6$) согласно анализам, аналогичным показанным на ФИГ. 11С.

[0019] На ФИГ. 12А–12D показано, что AZD2936 продемонстрировало более сильную противоопухолевую активность, чем антитело к PD-1 в модели опухоли OE21. Пунктирные вертикальные линии на ФИГ. 12А и 12В показывают дозировку лекарственного средства для внутрибрюшинных (в/б) инъекций.

[0020] На ФИГ. 13А–13D показано, что AZD2936 обладало большей противоопухолевой активностью, чем антитело к PD-1, в модели опухоли PC9-MART1. Пунктирные вертикальные линии на ФИГ. 13А и 13В показывают дозировку лекарственного средства для внутрибрюшинных (в/б) инъекций.

[0021] На ФИГ. 14А–14В показан процент содержания живых, экспрессирующих PD-1 и TIGIT клеток Jurkat, (ФИГ. 14А) или клеток Дауди (ФИГ. 14В) после инкубации с AZD2936, изотипическим контролем IgG1-ТМ, ритуксимабом или изотипическим контролем IgG1 вместе с комплементсодержащей человеческой сывороткой крови или с подвергнутой тепловой инактивации человеческой сывороткой крови, как описано в примере 6. Планки погрешностей отображают ст. откл. ($n = 2$).

[0022] На ФИГ. 15 показан специфический киллинг клеток Jurkat, экспрессирующих PD-1 и TIGIT, или клеток Дауди первичными человеческими РВМС. Зависимая от концентрации антитело-зависимая клеточная цитотоксичность (ADCC) опосредовалась ритуксимабом, но не изотипическим контролем IgG1, AZD2936 или изотипическим контролем IgG1 ТМ, как описано в примере 6. Планки погрешностей отображают ст. откл. ($n = 2$).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0023] Описание относится к связывающимся белкам, включая антитела, которые связываются с PD-1 и TIGIT. Описание также относится к композициям, содержащим указанные связывающиеся белки, и молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим указанные связывающиеся белки. Описание дополнительно относится к способам лечения расстройства или состояния с использованием указанных связывающихся белков.

[0024] При использовании в соответствии с настоящим описанием, если не указано иное, все технические и научные термины следует понимать как имеющие то же значение, которое обычно подразумевается специалистом в данной области. За исключением случаев, когда из контекста явно следует иное, термины в единственном числе включают множественное число, а термины во множественном — единственное.

[0025] Используемый в настоящем документе термин «антитело», относится к белку, который способен распознавать антиген и специфически связываться с ним. Стандартные или обычные антитела млекопитающих содержат тетрамер, который, как правило, состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, причем каждая пара состоит из одной «легкой» цепи (как правило, имеющей молекулярную массу примерно 25 кДа) и одной «тяжелой» цепи (как правило, имеющей молекулярную массу примерно 50–70 кДа). Термины «тяжелая цепь» и «легкая цепь», используемые в настоящем документе, относятся к любому полипептиду иммуноглобулина, имеющему последовательность переменного домена, достаточную для обеспечения специфичности в отношении антигена-мишени. Аминоконцевой участок каждой легкой и тяжелой цепи, как правило, включает переменный домен из примерно от 100 до 110 или более аминокислот, который, как правило, отвечает за распознавание антигена. Карбоксиконцевой участок каждой цепи, как правило, определяет константный домен, отвечающий за эффекторную функцию. Таким образом, в природном антителе полноразмерный полипептид тяжелой цепи иммуноглобулина включает переменный домен (V_H) и три константных домена (C_{H1} , C_{H2} и C_{H3}), а также шарнирную область между C_{H1} и

C_{H2} , причем домен V_H располагается на амино-конце полипептида, а домен C_{H3} располагается на карбоксильном конце, а полипептид полноразмерной легкой цепи иммуноглобулина включает переменный домен (V_L) и константный домен (C_L), причем V_L -домен располагается на амино-конце полипептида, а C_L -домен располагается на карбоксильном конце. Однако для специалистов в данной области понятно, что расположения доменов в природных антителах могут быть изменены в определенных форматах антителоподобных связывающихся белков без потери антигенсвязывающей способности. Классы легких цепей человека называются легкими цепями каппа и лямбда.

[0026] В некоторых аспектах константная область легкой цепи принадлежит к каппа-цепи. В некоторых аспектах константная область легкой цепи принадлежит к лямбда-цепи.

[0027] В пределах полноразмерных легкой и тяжелой цепей переменные и константные домены, как правило, соединены областью J из примерно 12 или более аминокислот, причем тяжелая цепь также включает область D из примерно 10 или более аминокислот. Переменные области каждой пары легкой/тяжелой цепей, как правило, образуют антигенсвязывающий сайт. Переменные домены антител природного происхождения, как правило, демонстрируют одинаковую общую структуру относительно консервативных каркасных областей (FR), соединенных тремя гиперпеременными областями, также называемыми определяющими комплементарность областями или CDR. CDR из двух цепей каждой пары, как правило, выровнены каркасными областями, что может обеспечивать связывание с конкретным эпитопом. От амино-конца до карбоксильного конца переменные домены и легкой, и тяжелой цепи, как правило, содержат домены FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4.

[0028] Термин «фрагмент антитела» относится к части интактной или полноразмерной цепи антитела по существу к целевой связывающей или переменной области. Примеры фрагментов антитела включают, без ограничений, фрагменты F_{ab} , F_{ab}' , $F_{(ab)2}$ и F_v . Используемый в настоящем документе термин

«функциональный фрагмент» по существу синонимичен термину «фрагмент антитела», и в отношении антител он может относиться к фрагментам антитела, таким как F_v , F_{ab} , $F_{(ab)2}$.

[0029] Нумерация описанных в настоящем документе аминокислотных остатков осуществляется в соответствии с системой нумерации ЕС (также описанной в *Kabat et al*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)).

[0030] Термин «вектор» относится к любой молекуле (например, нуклеиновой кислоте, плазмиде или вирусу), которую используют для передачи кодирующей информации клетке-хозяину. Одним типом вектора может служить «плазида», которая относится к кольцевой двухцепочечной молекуле ДНК, в которую могут быть вставлены дополнительные сегменты ДНК. Другой тип вектора представляет собой вирусный вектор, в котором дополнительные сегменты ДНК могут быть вставлены в вирусный геном. Определенные векторы способны к независимой репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие точку начала репликации бактерии и эписомные векторы млекопитающих). Векторы другого типа (например, неэписомные векторы млекопитающих) могут интегрироваться в геном клетки-хозяина после введения в клетку-хозяина и таким образом реплицируются вместе с геномом клетки-хозяина. Определенные векторы дополнительно способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально связаны. Указанные векторы в настоящем документе называют «экспрессионными векторами».

[0031] Используемый в настоящем документе термин «человеческое антитело» включает антитела, имеющие переменные и константные области, по существу соответствующие последовательностям иммуноглобулина зародышевой линии человека. В некоторых аспектах человеческие антитела продуцируются у млекопитающих, отличных от человека, включая, без ограничений, грызунов, таких как мыши и крысы, и зайцеобразных, таких как кролики. В других аспектах человеческие антитела продуцируются в гибридных клетках. В других аспектах

человеческие антитела получают рекомбинантным способом. В некоторых аспектах биспецифически связывающийся белок представляет собой человеческое или гуманизированное антитело.

[0032] Термин «антиген» или «антиген-мишень», используемый в настоящем документе, относится к молекуле или части молекулы, которую связывающиеся белки по описанию могут распознавать и связывать. Антиген-мишень можно вводить животному для получения антител, способных связываться с эпитопом этого антигена. Антиген-мишень может иметь один или более эпитопов.

[0033] Используемый в настоящем документе термин «эпитоп», относится к области или структурному элементу антигена, который связывающийся белок по описанию распознает и связывает. В частности, эпитоп — это специфическая структура, которая связывается областями CDR связывающегося белка. Эпитопы могут содержать структурные элементы белка, углеводы или даже части липидных структур, обнаруженных в мембранах. Считается, что связывающийся белок специфически связывает антиген, когда он преимущественно распознает свою антигенную мишень в сложной смеси белков и/или макромолекул. Термин «специфически связывается» относится к связывающемуся белку, который специфически связывается с молекулой или ее фрагментом (например, с антигеном). Связывающийся белок, который специфически связывает молекулу или ее фрагмент, может связываться с другими молекулами с более низкой аффинностью, что определяется, например, посредством иммуноанализов, анализа ВІАcore или других видов анализов, известных в данной области. В частности, антитела или фрагменты, которые специфически связываются по меньшей мере с одной молекулой или ее фрагментом, могут иметь преимущество в конкуренции с молекулами, которые связываются неспецифически. В частности, настоящее описание охватывает антитела с множественной специфичностью (например, антитело со специфичностью в отношении двух или более отдельных антигенов. Например, биспецифическое антитело может связываться с двумя смежными

эпитопами одного антигена-мишени или может связываться с двумя разными антигенами.

[0034] Термин «антигенсвязывающий сайт», используемый в настоящем документе, относится к сайту, созданному на поверхности связывающегося белка по описанию, где связывается антиген или эпитоп антигена. Антигенсвязывающий сайт связывающегося белка, как правило, описывается со ссылкой на петлевые структуры, созданные определяющими комплементарность областями (CDR) связывающегося белка.

[0035] В некоторых аспектах связывающиеся белки, представленные в настоящем документе, являются биспецифическими. В настоящем документе описаны биспецифически связывающиеся белки, обладающие специфичностью связывания по меньшей мере к двум независимым антигенам (или мишеням) или к различным эпитомам в пределах одного и того же антигена. Типичные биспецифически связывающиеся белки могут связываться с двумя разными эпитопами мишени или могут связываться две разные мишени. Другие такие связывающиеся белки могут объединять сайт связывания с первой мишенью с сайтом связывания с другой мишенью. В некоторых аспектах связывающийся белок представляет собой биспецифическое антитело.

[0036] В некоторых аспектах биспецифические антитела обеспечивают аддитивные и/или синергические терапевтические эффекты, возникающие в результате одновременного воздействия на два антигена при введении одной сконструированной молекулы.

[0037] В некоторых аспектах антитела, обеспеченные в настоящем документе, представляют собой моновалентные биспецифические антитела (MBab). Описанные в настоящем документе основы моновалентных биспецифических антител обеспечивают превосходную платформу для создания биспецифических антител, которые обладают всеми преимуществами, связанными с биспецифическими антителами, одновременно снижая упомянутые выше потенциальные терапевтические риски, благодаря их моновалентной природе. Кроме этого,

представленные в настоящем документе МВаб легко экспрессируются, стабильны и, вероятно, обладают низкой иммуногенностью. Используемый в настоящем документе термин «моновалентный биспецифический», который можно сокращенно обозначать «МВаб», относится к биспецифическим антителам, где каждое плечо может специфически связываться с отличающимся антигеном-мишенью, и при наличии определенной пары различных антигенов-мишеней (А и В) МВаб может связываться с любым из них. В определенных аспектах моновалентные биспецифические антитела могут специфически связываться с двумя отдельными антигенами (или мишенями) или с двумя отдельными эпитопами одного и того же антигена. Как правило, моновалентные биспецифические антитела содержат две разные переменные области. В некоторых аспектах аффинность связывания к двум отдельным антигенам примерно одна и та же. В некоторых аспектах аффинности связывания к двум отдельным антигенам отличаются.

[0038] В некоторых аспектах в настоящем документе предложен биспецифически связывающийся белок, который специфически связывается с PD-1 и TIGIT, содержащий: а) первый связывающийся домен, который специфически связывается с PD-1, причем первый связывающийся домен содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и переменный домен легкой цепи, содержащий LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; и б) второй связывающийся домен, который специфически связывается с TIGIT, причем второй связывающийся домен содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, и переменный домен легкой

цепи, содержащий LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

[0039] В некоторых аспектах первый связывающийся домен, который специфически связывается с PD-1, содержит вариабельный домен тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и вариабельный домен легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В некоторых аспектах первый связывающийся домен, который специфически связывается с PD-1, содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

[0040] В некоторых аспектах первый связывающийся домен, который специфически связывается с PD-1, содержит вариабельный домен тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7. В некоторых аспектах первый связывающийся домен, который специфически связывается с PD-1, содержит вариабельный домен легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9.

[0041] В некоторых аспектах первый связывающийся домен, который специфически связывается с PD-1, содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8. В некоторых аспектах первый связывающийся домен, который специфически связывается с PD-1, содержит легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94,

95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10.

[0042] В некоторых аспектах второй связывающийся домен, который специфически связывает TIGIT, содержит переменный домен тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и переменный домен легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19. В некоторых аспектах второй связывающийся домен, который специфически связывается с TIGIT, содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

[0043] В некоторых аспектах второй связывающийся домен, который специфически связывается с TIGIT, содержит переменный домен тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17. В некоторых аспектах второй связывающийся домен, который специфически связывается с TIGIT, содержит переменный домен легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 19.

[0044] В некоторых аспектах второй связывающийся домен, который специфически связывается с TIGIT, содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18. В некоторых аспектах второй связывающийся домен, который специфически связывается с TIGIT, содержит легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20.

[0045] В некоторых аспектах первый связывающийся домен, который специфически связывается с PD-1, содержит переменный домен тяжелой цепи, который кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 21, а переменный домен легкой цепи кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 23. В некоторых аспектах первый связывающийся домен, который специфически связывается с PD-1, содержит тяжелую цепь, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 22, а легкая цепь кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 24.

[0046] В некоторых аспектах первый связывающийся домен, который специфически связывается с PD-1, содержит переменный домен тяжелой цепи, который кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 21, а переменный домен легкой цепи кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 23.

[0047] В некоторых аспектах первый связывающийся домен, который специфически связывается с PD-1, содержит тяжелую цепь, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты, которая имеет на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 22, а легкая цепь кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 24.

[0048] В некоторых аспектах второй связывающийся домен, который специфически связывает TIGIT, содержит переменный домен тяжелой цепи, который кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 25, и переменный домен легкой цепи, который кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 27. В некоторых аспектах второй связывающийся домен, который специфически связывается с TIGIT, содержит тяжелую цепь, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 26, и

легкую цепь, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 28.

[0049] В некоторых аспектах второй связывающийся домен, который специфически связывает TIGIT, содержит переменный домен тяжелой цепи, который кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична SEQ ID NO: 25, и переменный домен легкой цепи, который кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична ID NO: 27.

[0050] В некоторых аспектах второй связывающийся домен, который специфически связывается с TIGIT, содержит тяжелую цепь, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична SEQ ID NO: 26, и легкую цепь, которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична SEQ ID NO: 28.

[0051] В одном аспекте используемые биспецифически связывающиеся белки конкурируют с любыми биспецифически связывающимися белками, описанными в настоящем документе, за связывание как с PD-1, так и с TIGIT. В одном аспекте используемый связывающийся белок конкурирует с антителом, содержащим SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 19 за связывание как с PD-1, так и с TIGIT. В другом аспекте используемый связывающийся белок конкурирует с антителом, содержащим SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 20 за связывание как с PD-1, так и с TIGIT.

[0052] В одном аспекте описание обеспечивает нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую биспецифически связывающийся белок, как описано в настоящем документе.

[0053] В одном аспекте описание обеспечивает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую биспецифически связывающийся белок, как описано в настоящем документе, причем последовательность нуклеиновой кислоты

представляет собой одну или более из: последовательностей, на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичных SEQ ID NO:21, на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичных SEQ ID NO:23, на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичных SEQ ID NO:25 или на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, или на 99% идентичных SEQ ID NO:27. В одном аспекте последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность, на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную SEQ ID NO:21, последовательность, на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную SEQ ID NO:23, последовательность, на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную SEQ ID NO:25, и последовательность, на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную SEQ ID NO:27.

[0054] В одном аспекте последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая биспецифически связывающийся белок, как описано в настоящем документе, содержит SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25 и SEQ ID NO:27.

[0055] В одном аспекте описание обеспечивает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую биспецифически связывающийся белок, как описано в настоящем документе, причем последовательность нуклеиновой кислоты представляет собой одну или более из: последовательностей, на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичных SEQ ID NO:22, на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичных SEQ ID NO:24, на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичных SEQ ID NO:26 или на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, или на 99% идентичных SEQ ID NO:28. В одном аспекте последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность, на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную SEQ ID NO:22, последовательность, на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную SEQ ID NO:24, последовательность, на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную SEQ ID NO:26, и

последовательность, на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную SEQ ID NO:28.

[0056] В одном аспекте последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая биспецифически связывающийся белок, как описано в настоящем документе, содержит SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:26 и SEQ ID NO:28.

[0057] В одном аспекте описание обеспечивает клетку-хозяина, содержащую нуклеиновую кислоту, как описано в настоящем документе. В одном аспекте описание относится к клетке-хозяину, содержащей вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, как описано в настоящем документе. В одном аспекте описание относится к клетке-хозяину, имеющей нуклеиновую кислоту, описанную в настоящем документе, интегрированную в ее геном.

[0058] В одном аспекте описание относится к клетке-хозяину, содержащей вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную SEQ ID NO:21, последовательность нуклеиновой кислоты, на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную SEQ ID NO: 23, последовательность нуклеиновой кислоты, на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную SEQ ID NO:25, и/или последовательность нуклеиновой кислоты, на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную SEQ ID NO:27.

[0059] В одном аспекте описание относится к клетке-хозяину, содержащей вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную SEQ ID NO:22, последовательность нуклеиновой кислоты, на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную SEQ ID NO: 24, последовательность нуклеиновой кислоты, на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную SEQ ID NO:26, и/или последовательность нуклеиновой кислоты, на по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную SEQ ID NO:28.

[0060] В одном аспекте описание обеспечивает биспецифически связывающийся белок, продуцируемый клеткой-хозяином, как описано в настоящем документе.

[0061] Термин «нативная Fc», используемый в настоящем документе, относится к молекуле, содержащей последовательность неантигенсвязывающего фрагмента, полученного в результате расщепления антитела или полученного другими способами, как в мономерной, так и в мультимерной форме, и может содержать шарнирную область. Исходный источник иммуноглобулина нативной Fc предпочтительно имеет человеческое происхождение и может представлять собой любой из иммуноглобулинов. Молекулы нативной Fc состоят из мономерных полипептидов, которые могут быть связаны в димерные или мультимерные формы посредством ковалентных (т. е. дисульфидных связей) и нековалентных ассоциаций. Количество межмолекулярных дисульфидных связей между мономерными субъединицами молекул нативных Fc колеблется от 1 до 4 в зависимости от класса (например, IgG, IgA и IgE) или подкласса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgA1 и IgGA2). Одним из примеров нативной Fc является димер с дисульфидными связями, образующийся в результате расщепления IgG папаином. Термин «нативная Fc», используемый в настоящем документе, является общим для мономерных, димерных и мультимерных форм.

[0062] В некоторых аспектах область Fc представляет собой или включает домен, который представляет собой одну или более областей Fc из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE или IgD. В некоторых аспектах антитело представляет собой антитело IgG1.

[0063] Термин «вариант Fc», используемый в настоящем документе, относится к молекуле или последовательности, которая модифицирована из нативной Fc, но по-прежнему содержит сайт связывания для рецептора реутилизации FcRn (неонатального рецептора Fc). Специалистам в данной области известны типичные варианты Fc и их взаимодействие с рецептором реутилизации. Таким образом, термин «вариант Fc» может включать молекулу или последовательность, которая гуманизирована из нативной Fc, не относящейся к человеку. Кроме того, нативная Fc содержит области, которые можно удалять или подвергать мутациям для получения варианта Fc с изменением определенных остатков, которые

обеспечивают структурные особенности или биологическую активность, которые не требуются для связывающихся белков по описанию. Таким образом, термин «вариант Fc» включает молекулу или последовательность, в которой отсутствует один или более из нативных сайтов или остатков Fc либо в которой модифицирован один или более из сайтов или остатков Fc, влияющих на: (1) формирование дисульфидной связи, (2) несовместимость с выбранной клеткой-хозяином, (3) N-концевую гетерогенность при экспрессии в выбранную клетку-хозяина, (4) гликозилирование, (5) взаимодействие с комплементом, (6) связывание с рецептором Fc, отличным от рецептора реутилизации, или (7) антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) или участвующих в них.

[0064] В некоторых аспектах биспецифически связывающийся белок содержит вариантную область Fc, содержащую по меньшей мере одну замену, выбранную из 221K, 221Y, 225E, 225K, 225W, 228P, 234D, 234E, 234N, 234Q, 234T, 234H, 234Y, 234I, 234V, 234F, 235A, 235D, 235R, 235W, 235P, 235S, 235N, 235Q, 235T, 235H, 235Y, 235I, 235V, 235E, 235F, 236E, 237L, 237M, 237P, 239D, 239E, 239N, 239Q, 239F, 239T, 239H, 239Y, 240I, 240A, 240T, 240M, 241W, 241L, 241Y, 241E, 241R, 243W, 243L, 243Y, 243R, 243Q, 244H, 245A, 247L, 247V, 247G, 250E, 250Q, 251F, 252L, 252Y, 254S, 254T, 255L, 256E, 256F, 256M, 257C, 257M, 257N, 262I, 262A, 262T, 262E, 263I, 263A, 263T, 263M, 264L, 264I, 264W, 264T, 264R, 264F, 264M, 264Y, 264E, 265A, 265G, 265N, 265Q, 265Y, 265F, 265V, 265I, 265L, 265H, 265T, 266I, 266A, 266T, 266M, 267Q, 267L, 268E, 269H, 269Y, 269F, 269R, 270E, 280A, 284M, 292P, 292L, 296E, 296Q, 296D, 296N, 296S, 296T, 296L, 296I, 296H, 296G, 297S, 297D, 297E, 298A, 298H, 298I, 298T, 298F, 299I, 299L, 299A, 299S, 299V, 299H, 299F, 299E, 305I, 308F, 313F, 316D, 318A, 318S, 320A, 320S, 322A, 322S, 325Q, 325L, 325I, 325D, 325E, 325A, 325T, 325V, 325H, 326A, 326D, 326E, 326G, 326M, 326V, 327G, 327W, 327N, 327L, 328S, 328M, 328D, 328E, 328N, 328Q, 328F, 328I, 328V, 328T, 328H, 328A, 329F, 329H, 329Q, 330K, 330G, 330T, 330C, 330L, 330Y, 330V, 330I, 330F, 330R, 330H, 331G, 331A, 331L, 331M, 331F, 331W, 331K, 331Q, 331E, 331S, 331V, 331I, 331C, 331Y, 331H, 331R, 331N, 331D, 331T, 332D, 332S, 332W, 332F, 332E, 332N,

332Q, 332T, 332H, 332Y, 332A, 333A, 333D, 333G, 333Q, 333S, 333V, 334A, 334E, 334H, 334L, 334M, 334Q, 334V, 334Y, 339T, 370E, 370N, 378D, 392T, 396L, 416G, 419H, 421K, 428L, 428F, 433K, 433L, 434A, 434W, 434Y, 436H, 440Y и 443W при нумерации согласно индексу ЕС по Кабату.

[0065] В некоторых аспектах вариантная область Fc содержит одну или более модификаций в положениях, выбранных из 428 и 434 при нумерации согласно индексу ЕС по Кабату. В некоторых аспектах вариантная область Fc содержит одну или более аминокислотных замен в положениях, выбранных из 428 и 434 при нумерации согласно индексу ЕС по Кабату. В некоторых аспектах вариантная область Fc содержит одну или более аминокислотных замен, выбранных из 428L, 428F, 434A, 434W и 434Y.

[0066] Инженерия области Fc широко используется в данной области техники для продления периода полужизни терапевтических антител и защиты от распада *in vivo*. В некоторых аспектах область Fc антитела IgG или антигенсвязывающего фрагмента может быть модифицирована для увеличения аффинности молекулы IgG к неонатальному рецептору Fc (FcRn), который опосредует катаболизм IgG и защищает молекулы IgG от распада.

[0067] В данной области известны и другие приемлемые аминокислотные замены или модификации области Fc и включают, например, тройную замену метионина (M) на тирозин (Y) в положении 252, замену серина (S) на треонин (T) в положении 254 и замену треонина (T) на глутаминовую кислоту (E) в положении 256, причем нумерация проведена согласно индексу ЕС по Кабату (M252Y/S254T/T256E; обозначается как «YTE» или «мутация YTE») (см., например, патент США 7,658,921; публикацию патентной заявки США 2014/0302058; и Yu et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 61(1): e01020-16 (2017), причем каждая из них полностью включена в настоящий документ посредством ссылки).

[0068] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат область Fc, которая была сконструирована для увеличения периода

полужизни. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат область Fc с мутацией YTE.

[0069] В некоторых аспектах область Fc является агликозилированной. В некоторых аспектах область Fc является дегликозилированной. В некоторых аспектах область Fc имеет уменьшенное фукозилирование или является афукозилированной.

[0070] В некоторых аспектах антитело с вариантной областью Fc или его связывающий фрагмент имеют повышенную аффинность связывания к FcRn.

[0071] Тройная мутация (TM) L234F/L235E/P331S (согласно соглашению Европейского Союза по нумерации; Sazinsky et al. Proc Natl Acad Sci USA, 105:20167-20172 (2008)) в константной области тяжелой цепи может значительно снижать эффекторную функцию IgG. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат область Fc с тройной мутацией (TM) L234F/L235E/P331S.

[0072] В некоторых аспектах антитело с вариантной областью Fc или его связывающий фрагмент обладают сниженной комплемент-зависимой цитотоксичностью (CDC) при введении *in vivo*. В некоторых аспектах антитело с вариантной областью Fc или его связывающий фрагмент имеют пониженный уровень CDC по сравнению с антителом или его связывающим вариантом, которые содержат область Fc дикого типа. В некоторых аспектах антитело с вариантной областью Fc или его связывающий фрагмент не запускают CDC при введении *in vivo*. В некоторых аспектах антитело с вариантной областью Fc или его связывающий фрагмент вызывают снижение CDC при введении *in vivo*. В некоторых аспектах антитело с вариантной областью Fc или его связывающий фрагмент, имеющие пониженную CDC-активность или не имеющие CDC-активности, содержат тройную мутацию (L234F/L235E/P331S) в вариантной области Fc.

[0073] В некоторых аспектах антитело с вариантной областью Fc или его связывающий фрагмент обладает сниженной антителозависимой клеточной цитотоксичностью (ADCC) при введении *in vivo*. В некоторых аспектах антитело с

вариантной Fc дикого типа или его связывающий фрагмент имеют пониженный уровень ADCC по сравнению с антителом или его вариантным связывающим фрагментом, которые содержат область Fc дикого типа. В некоторых аспектах антитело с вариантной областью Fc или его связывающий фрагмент не запускают ADCC при введении *in vivo*. В некоторых аспектах антитело с вариантной областью Fc или его связывающий фрагмент вызывают снижение ADCC при введении *in vivo*. В некоторых аспектах антитело с вариантной областью Fc или его связывающий фрагмент, имеющие пониженную ADCC-активность или не имеющие ADCC-активности, содержат тройную мутацию (L234F/L235E/P331S) в вариантной области Fc.

[0074] В некоторых аспектах антитело или его связывающий фрагмент, имеющие пониженную активность CDC, обладают пониженной токсичностью при введении субъекту. В некоторых аспектах антитело или его связывающий фрагмент, имеющие пониженную активность ADCC, обладают пониженной токсичностью при введении субъекту.

[0075] Термин «Fc-домен», используемый в настоящем документе, охватывает нативную Fc, а также варианты и последовательности Fc, как определено выше. Как в случае с молекулами вариантных Fc и нативных Fc, термин «Fc-домен» включает обозначения молекул в мономерной или мультимерной форме, полученных либо путем расщепления цельного антитела, либо другими способами.

[0076] Чтобы улучшить выход связывающихся белков, домены C_{H3} можно изменять с помощью технологии «выступы во впадины», которая подробно описана на примере нескольких показательных молекул, например в международной публикации № WO 96/027011, Ridgway *et al.*, 1996, *Protein Eng.* 9: 617-21; и Merchant *et al.*, 1998, *Nat. Biotechnol.* 16: 677-81. В частности, поверхности взаимодействия двух C_{H3}-доменов изменяются, чтобы увеличить гетеродимеризацию обеих тяжелых цепей, содержащих эти два домена C_{H3}. Каждый из двух C_{H3}-доменов (двух тяжелых цепей) может быть «выступом», а другой — «впадиной». Образование

дисульфидного мостика дополнительно стабилизирует гетеродимеры (Merchant *et al.*, 1998; Atwell *et al.*, 1997, *J. Mol. Biol.* 270: 26-35) и повышает выход продукта.

[0077] В некоторых аспектах связывающиеся белки имеют формат DuetMab. DuetMab имеет следующую базовую структуру: область Fc, имеющая модифицированную тяжелую цепь, причем в области C_{H1} модифицированной тяжелой цепи нативный цистеин заменен на другую аминокислоту, а нативная аминокислота, не являющаяся цистеином, заменена на аминокислоту цистеин; модифицированная соответствующая легкая цепь, причем область C_L модифицированной легкой цепи также имеет замену нативного цистеина на аминокислоту, не являющуюся цистеином, и замену нативной, не являющейся цистеином аминокислоты, на аминокислоту цистеин; вторая область Fc, имеющая вторую тяжелую цепь; и вторая соответствующая модифицированная легкая цепь, причем модифицированная тяжелая цепь непосредственно связана с соответствующей модифицированной легкой цепью, и на отдельном, связывающемся с мишенью плече вторая тяжелая цепь непосредственно связана со второй соответствующей легкой цепью, и при этом замещенный цистеин модифицированной тяжелой цепи, полученный в результате замены нативной, не являющейся цистеином аминокислоты, на аминокислоту цистеин, и замещенный цистеин модифицированной соответствующей легкой цепи, полученный в результате замены нативной, не являющейся цистеином аминокислоты на аминокислоту цистеин, могут образовывать дисульфидную связь. Информацию по DuetMab можно найти, например, в патенте США № 9,527,927, полностью включенном в настоящий документ посредством ссылки.

[0078] Термин K_D, используемый в настоящем документе, относится к константе диссоциации ($KD = [A] \times [B] / [AB]$) взаимодействия между связывающимся белком по описанию и антигеном-мишенью, которая выражается в моль/литр. Связывающийся белок по описанию, как правило, имеет величину константы диссоциации (K_D) от 10⁻⁵ до 10⁻¹² моль/литр или менее, или от 10⁻⁷ до 10⁻¹² моль/литр или менее, или от 10⁻³ до 10⁻¹². моль/литр и/или величину аффинности связывания,

равную по меньшей мере 10^7 M^{-1} , или по меньшей мере 10^8 M^{-1} , или по меньшей мере 10^9 M^{-1} , или по меньшей мере 10^{12} M^{-1} . Любое значение K_D более 10^{-4} моль/литр по существу считается указывающим на неспецифическое связывание. Следовательно, чем меньше значение K_D , тем выше аффинность. В некоторых аспектах связывающийся белок по описанию будет связываться с целевым антигеном с величиной аффинности менее 500 нМ, или менее 200 нМ, или менее 10 нМ, или менее 500 пМ. Высокая аффинность или очень большой уровень связывания часто связаны с большей эффективностью, но не всегда выполняется условие, что чем выше аффинность, тем выше эффективность.

[0079] Величину константы диссоциации (K_D) можно определять, например, посредством поверхностного плазмонного резонанса (ППР). По существу анализ методом поверхностного плазмонного резонанса измеряет связывающие взаимодействия в реальном времени (как скорость связывания, так и скорость диссоциации) между лигандом (антигеном-мишенью на матрице биосенсора) и аналитом посредством поверхностного плазмонного резонанса с использованием, например, системы VIAcore® (Pharmacia Biosensor; г. Пискатауэй, штат Нью-Джерси, США). Анализ методом поверхностного плазмонного резонанса также можно осуществлять посредством иммобилизации аналита и представления лиганда. Специфическое связывание связывающегося белка по описанию с антигеном или антигенной детерминантой можно также определять любым приемлемым способом, известным в данной области, включая, например, анализ по методу Скэтчарда и/или анализы конкурентного связывания, такие как радиоиммуноанализ (RIA), фермент-связанное иммуносорбентное исследование (ELISA), иммуноферментный анализ (EIA) и конкурентный «сэндвич»-анализ.

[0080] В одном аспекте величина равновесной константы диссоциации (K_D) взаимодействия биспецифически связывающегося белка, как описано в настоящем документе, с человеческим TIGIT менее или равна примерно 15 пМ. В одном аспекте величина K_D взаимодействия биспецифически связывающегося белка, как описано в настоящем документе, с человеческим TIGIT менее или равна примерно 9 пМ. В

одном аспекте величина K_D взаимодействия биспецифически связывающегося белка, как описано в настоящем документе, с человеческим TIGIT менее или равна примерно 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9 или 8 пМ.

[0081] В одном аспекте величина K_D взаимодействия биспецифически связывающегося белка, как описано в настоящем документе, с человеческим TIGIT равна от примерно 9 пМ до примерно 15 пМ. В одном аспекте величина K_D взаимодействия биспецифически связывающегося белка, как описано в настоящем документе, с человеческим TIGIT равна от примерно 10 пМ до примерно 15 пМ. В одном аспекте величина K_D взаимодействия биспецифически связывающегося белка, как описано в настоящем документе, с человеческим TIGIT равна от примерно 11 пМ до примерно 15 пМ. В одном аспекте величина K_D взаимодействия биспецифически связывающегося белка, как описано в настоящем документе, с человеческим TIGIT равна от примерно 12 пМ до примерно 15 пМ. В одном аспекте величина K_D взаимодействия биспецифически связывающегося белка, как описано в настоящем документе, с человеческим TIGIT равна от примерно 13 пМ до примерно 15 пМ. В одном аспекте величина K_D взаимодействия биспецифически связывающегося белка, как описано в настоящем документе, с человеческим TIGIT равна от примерно 14 пМ до примерно 15 пМ.

[0082] В одном аспекте величина K_D взаимодействия биспецифически связывающегося белка, как описано в настоящем документе, с человеческим PD-L1 менее или равна примерно 0,4 пМ. В одном аспекте величина K_D взаимодействия биспецифически связывающегося белка, как описано в настоящем документе, с человеческим PD-L1 равна от примерно 0,2 пМ до примерно 0,5 пМ. В одном аспекте величина K_D взаимодействия биспецифически связывающегося белка, как описано в настоящем документе, с человеческим PD-L1 равна от примерно 0,3 пМ до примерно 0,5 пМ. В одном аспекте величина K_D взаимодействия биспецифически связывающегося белка, как описано в настоящем документе, с человеческим PD-L1 равна от примерно 0,4 пМ до примерно 0,5 пМ.

[0083] В особых аспектах в настоящем документе предложен способ лечения страдающего от заболевания или состояния субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества связывающихся белков, описанных в настоящем документе. Описание относится к способам индукции иммунного ответа у субъекта, а также к способам лечения или профилактики опухоли и/или рака у субъекта посредством введения субъекту белков, молекул нуклеиновой кислоты и/или композиций.

[0084] В конкретных аспектах в настоящем документе предложен способ индукции иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту биспецифического белка, как описано в настоящем документе. В одном аспекте в настоящем документе предложен способ индукции иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем документе. В одном аспекте в настоящем документе предложен способ индукции иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции, как описано в настоящем документе.

[0085] В одном аспекте в настоящем документе для применения в терапии обеспечен биспецифический белок, как определено в настоящем документе. В одном аспекте в настоящем документе для применения в лечении рака обеспечен биспецифический белок, как определено в настоящем документе. В одном аспекте в настоящем документе для применения в производстве лекарственного препарата для лечения рака обеспечен биспецифический белок, как определено в настоящем документе. В одном аспекте в настоящем документе для применения в терапии обеспечена нуклеиновая кислота, как определено в настоящем документе. В одном аспекте в настоящем документе для применения в лечении рака обеспечена нуклеиновая кислота, как определено в настоящем документе. В одном аспекте в настоящем документе для применения в производстве лекарственного препарата для лечения рака обеспечена нуклеиновая кислота, как определено в настоящем документе.

[0086] В одном аспекте способ лечения включает введение субъекту терапевтически эффективного количества связывающихся белков, описанных в настоящем документе, в комбинации с дополнительным противоопухолевым соединением. В некоторых аспектах противоопухолевое соединение представляет собой низкомолекулярное лекарственное средство. В некоторых аспектах противоопухолевое соединение представляет собой пеметрексед, карбоплатин, гемцитабин, цисплатин, паклитаксел или их комбинации. В некоторых аспектах связывающийся белок и дополнительное противораковое средство вводят одновременно. В некоторых аспектах связывающийся белок и дополнительное противораковое средство не вводят одновременно, но вводят в течение одного курса лечения.

[0087] Термины «заболевание» или «состояние» относятся к любому состоянию, при котором может быть полезно лечение с использованием способов по описанию. Термины «заболевание» и «состояние» используются в настоящем документе взаимозаменяемо и их значения включают хронические и острые расстройства или заболевания, включая те патологические состояния, которые определяют развитие у пациента рассматриваемого расстройства. В некоторых аспектах заболевание представляет собой опухоль. В некоторых аспектах заболевание представляет собой солидную опухоль. В некоторых аспектах заболевание представляет собой рак. В некоторых аспектах рак представляет собой один или более видов рака, выбранных из рака яичников, рака молочной железы, колоректального рака, рака простаты, рака шейки матки, рака матки, рака яичка, рака мочевого пузыря, рака головы и шеи, меланомы, рака поджелудочной железы, почечноклеточной карциномы и рака легких. В некоторых аспектах заболевание представляет собой немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ). В некоторых аспектах НМРЛ является распространенным или метастатическим. В некоторых аспектах распространенный НМРЛ представляет собой НМРЛ на стадии III или стадии IV.

[0088] Термин «субъект» предназначен для обозначения человека и животных, особенно млекопитающих. В определенных аспектах субъектом является пациент-человек.

[0089] Термины «лечение» или «лечить», используемые в настоящем документе, относятся как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или превентивным мерам. К требующим лечения относятся субъекты, имеющие заболевание или болезненное состояние, а также субъекты, склонные к заболеванию или состоянию, или те, которым необходима профилактика заболевания или состояния.

[0090] Используемый в настоящем документе термин «введение» относится к обеспечению, приведению в контакт и/или доставке соединения или соединений любым подходящим способом для достижения желаемого эффекта. Введение может включать, без ограничений, пероральное, сублингвальное, парентеральное (например, внутривенную, подкожную, внутрикожную, внутримышечную, внутрисуставную, внутриартериальную, внутрисиновиальную, внутригрудинную, интратекальную, внутриочаговую или внутричерепную инъекцию), чрескожное, топикальное, трансбуккальное, ректальное, вагинальное, назальное, офтальмологическое, ингаляционное введение и введение с помощью имплантатов.

[0091] Используемые в настоящем документе термины «вводят совместно» или «в комбинации» относятся к одновременному или последовательному введению множества соединений или агентов. Первое соединение или агент можно вводить до, во время или после введения второго соединения или агента. Первое соединение или агент и второе соединение или агент можно вводить одновременно или последовательно в один и тот же день или можно последовательно вводить в течение 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 1 недели, 2 недель, 3 недель или 1 месяца друг за другом. В некоторых аспектах соединения или агенты вводят совместно в течение периода, в котором каждое из данных соединений или агентов имеет по меньшей мере некоторый физиологический эффект и/или сохраняет эффективность.

[0092] Термин «фармацевтическая композиция» или «терапевтическая композиция», используемый в настоящем документе, относится к соединению или композиции, способными вызывать желаемый терапевтический эффект при надлежащем введении пациенту. В некоторых аспектах описание относится к фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель и терапевтически эффективное количество связывающихся белков по описанию.

[0093] Термины «терапевтически эффективная доза» или «терапевтическая доза» обозначают количество терапевтического средства, достаточное для достижения желаемых клинических результатов (т. е. достижения терапевтической эффективности). Терапевтически эффективная доза может быть введена за один или более приемов.

[0094] Термины «фармацевтически приемлемый носитель» или «физиологически приемлемый носитель», используемые в настоящем документе, относятся к одному или более входящим в состав материалов, приемлемым для осуществления или улучшения доставки одного или более связывающихся белков по описанию.

[0095] В некоторых аспектах связывающиеся белки, описанные в настоящем документе, могут быть использованы в одном составе вместе с фармацевтически приемлемым носителем, наполнителем или стабилизатором в виде фармацевтических композиций. В определенных аспектах указанные фармацевтические композиции приемлемы для введения человеку или животному посредством любого одного или более способов введения с использованием известных в данной области способов. Термин «фармацевтически приемлемый носитель» означает один или более нетоксичных материалов, которые не влияют на эффективность биологической активности активных ингредиентов. Указанные препараты обычно могут содержать соли, буферные агенты, консерванты, совместимые носители и необязательно другие терапевтические агенты. Указанные фармацевтически приемлемые препараты могут также содержать совместимые твердые или жидкие наполнители, разбавители или инкапсулирующие материалы,

приемлемые для введения человеку. Другие предполагаемые носители, эксципиенты и/или добавки, которые можно использовать в описанных в настоящем документе составах, включают, например, ароматизаторы, противомикробные средства, подсластители, антиоксиданты, антистатики, липиды, белковые эксципиенты, такие как сывороточный альбумин, желатин, казеин, солеобразующие противоионы, такие как натрий и т. п. Эти и другие известные фармацевтические носители, эксципиенты и/или добавки, приемлемые для применения в описанных в данном документе составах, известны в данной области, например, как те, которые перечислены в «Remington: The Science & Practice of Pharmacy," 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins, (2005) и в "Physician's Desk Reference," 60th ed., Medical Economics, Montvale, N.J. (2005). Могут быть выбраны фармацевтически приемлемые носители, которые приемлемы для требуемого или необходимого способа введения, уровня растворимости и/или стабильности.

[0096] В некоторых аспектах фармацевтические композиции по описанию включают дополнительное противоопухолевое соединение. В некоторых аспектах противоопухолевое соединение представляет собой низкомолекулярное лекарственное средство. В некоторых аспектах противоопухолевое соединение представляет собой пеметрексед, карбоплатин, гемцитабин, цисплатин, паклитаксел или их комбинации. В некоторых аспектах противоопухолевое соединение представляет собой пеметрексед. В некоторых аспектах противоопухолевое соединение представляет собой карбоплатин. В некоторых аспектах противоопухолевое соединение представляет собой гемцитабин. В некоторых аспектах противоопухолевое соединение представляет собой цисплатин. В некоторых аспектах противоопухолевое соединение представляет собой паклитаксел.

[0097] В одном аспекте составы по описанию представляют собой апирогенные составы, которые по существу не содержат эндотоксинов и/или родственных пирогенных веществ. Эндотоксины включают токсины, которые содержатся внутри микроорганизма и высвобождаются только при разрушении или гибели

микроорганизмов. К пирогенным веществам относятся также жароповышающие термостабильные вещества (гликопротеины) наружной мембраны бактерий и других микроорганизмов. Оба эти вещества при введении их людям могут вызвать лихорадку, гипотонию и шок. В связи с потенциальными вредными эффектами, даже малые количества эндотоксинов должны быть удалены из растворов лекарственных средств для внутривенного введения. Управление по контролю качества пищевых продуктов и медикаментов (FDA) установило верхний предел, составляющий 5 единиц эндотоксина (ЕЭ) на дозу на килограмм массы тела для периода в один час при внутривенном введении лекарственных средств (The United States Pharmacopeial Convention, Pharmacopeial Forum 26(1): 223 (2000)). В определенных аспектах уровни эндотоксина и пирогена в композиции составляют менее 10 ЕЭ/мг или менее 5 ЕЭ/мг, или менее 1 ЕЭ/мг, или менее 0,1 ЕЭ/мг, или менее 0,01 ЕЭ/мг, или менее 0,001 ЕЭ/мг.

[0098] При использовании для введения *in vivo* составы по описанию должны быть стерильными. Составы по описанию можно стерилизовать различными методами стерилизации, включая, например, стерилизующую фильтрацию или радиационную стерилизацию. В одном аспекте состав стерилизуют фильтрованием с использованием предварительно стерилизованного фильтра с размером пор 0,22 мкм. Стерильные композиции для инъекции можно готовить в соответствии со стандартными принципами фармацевтической практики, описанными в “Remington: The Science & Practice of Pharmacy”, 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins, (2005).

[0099] В некоторых аспектах терапевтические композиции могут быть составлены для конкретных способов введения, таких как пероральное, назальное, легочное, местное (включая интрабуккальное и сублингвальное), ректальное, вагинальное и/или парентеральное введение. Термины «парентеральное введение» и «введенный парентерально», используемые в настоящем документе, относятся к способам введения, отличным от энтерального и местного введения, обычно путем инъекции, и включают, без ограничений, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, интракапсулярную, интраорбитальную,

внутрисердечную, внутрикожную, внутривнутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и внутригрудинную инъекцию и инфузию. Составы по описанию, приемлемые для местного или чрескожного введения, включают порошки, спреи, мази, пасты, кремы, лосьоны, гели, растворы, пластыри и ингаляторы. Антитела и другие активные вещества могут быть смешаны в стерильных условиях с фармацевтически приемлемым носителем и с любыми возможными требуемыми консервантами, буферами или пропеллентами (см., например, патенты США № 7,378,110; 7,258,873; и 7,135,180; Публикации патентных заявок США № 2004/0042972 и 2004/0042971).

[00100] Составы могут быть представлены в виде единичной дозированной формы и могут быть приготовлены любым известным в области фармации способом. Актуальные уровни дозировки активных ингредиентов в фармацевтических композициях по настоящему описанию могут варьироваться для получения количества активного ингредиента, которое эффективно для достижения желаемого терапевтического ответа у конкретного пациента, причем композиции и формат их введения не должны быть для пациента токсичными (например, «терапевтически эффективное количество»). Выбранный уровень дозировки будет зависеть от множества фармакокинетических факторов, включая активность конкретных используемых композиций, способ введения, время введения, скорость выведения конкретного используемого соединения, продолжительность лечения, другие лекарства, соединения и/или материалы, используемые в комбинации с конкретными используемыми композициями, возраст, пол, вес, состояние, общий уровень здоровья и предыдущий анамнез проходящего лечение пациента, а также другие подобные факторы, хорошо известные в области медицины. Эти дозы можно вводить ежедневно, еженедельно, раз в две недели, ежемесячно или реже, например два раза в год, в зависимости от дозировки, способа введения, типа расстройства и симптомов, подлежащих лечению, и индивидуальных особенностей субъекта. Дозировки можно также вводить путем непрерывной инфузии (например, с

помощью насоса). Вводимая доза может также зависеть от способа введения. Например, для подкожного введения может потребоваться большая дозировка, чем для внутривенного введения. Как отмечалось выше, любой обычно используемый режим дозирования (например, 1–10 мг/кг при инъекционном или инфузионном способе введения ежедневно или два раза в неделю) может быть адаптированным и приемлемым для способов лечения больных раком пациентов-людей.

[00101] Все представленные в настоящем документе материалы, включая патенты, патентные заявки, статьи, учебники и т. п., а также ссылки из них, полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

[00102] Ряд аспектов описания описаны в настоящем документе без ограничения с целью иллюстрации.

ПРИМЕРЫ

[00103] Представленные ниже примеры иллюстрируют конкретные аспекты описания и различные варианты его применения. Они изложены исключительно в пояснительных целях и не должны быть истолкованы как каким-либо образом ограничивающие область описания.

Пример 1. Получение и характеристика участка антитела к TIGIT биспецифических антител

[00104] Была разработана и охарактеризована серия моноклональных антител к TIGIT. Были рассмотрены последовательности переменных областей тяжелых и легких цепей дикого типа (WT) родительского VAR1 (P-VAR1): (VL WT + VH WT). В переменной области тяжелой цепи потенциальный риск окисления метионина был идентифицирован в области CDRH3, а потенциальный риск DP-фрагментации был идентифицирован в области CDRH3 (ФИГ. 1). В переменной области легкой цепи потенциальный риск окисления метионина был идентифицирован в области CDRL1 (ФИГ. 2). Для устранения этого потенциального окисления и для

обеспечения соответствия последовательностям зародышевой линии (GL) были созданы пять вариантов моноклональных антител:

[00105] VL WT + VH WT;

[00106] VL GL + VH WT;

[00107] VL WT + VH GL;

[00108] VL GL + VH GL;

[00109] VL GL (CDRL1 M-I) + VH GL

[00110] В частности, в вариабельной области тяжелой цепи мутация представляла собой замену первой аминокислоты E на Q для обеспечения соответствия последовательности зародышевой линии. В одном варианте в вариабельной области тяжелой цепи мутация представляла собой замену остатка метионина в CDRL1 на изолейцин, как и в последовательности зародышевой линии, для уменьшения потенциального окисления. Домены VH и VL P-VAR1 были успешно модифицированы без влияния на продуктивность и кинетику варианта. (таблица 1, ФИГ. 5 и 6). Кроме того, варианты не показали агрегации или фрагментации, а также значительной потери мономеров в ускоренном анализе термостабильности (таблица 2).

Таблица 1. Экспрессия и свойства спаривания вариантных DuetMab

Идентификатор образца	Объем культуры	Титр на 10/12 день* (мг/л)	% корректно спаренных LC	% мономеров в MabSelect Sure	к/л Хроматография	Итоговый % мономеров	Итоговый % корректно спаренных LC	Уровень эндотоксина	Итоговый выход
VL WT + VH WT	500 мл	72,2	92	82	Каппа	100	99	< 0,1 ЕЭ/мг	4 мг
VL GL + VH WT	500 мл	60,8	98	82	н/д	100	98	< 0,3 ЕЭ/мг	5 мг
VL WT + VH GL	500 мл	60,5	97	86,5	н/д	100	97	< 0,5 ЕЭ/мг	5 мг
VL GL + VH GL	500 мл	66,7	96	84	н/д	100	96	< 0,1 ЕЭ/мг	7 мг
VL GL (CDRL1 M-I) + VH GL	500 мл	65,2	96	83	н/д	100	96	< 0,5 ЕЭ/мг	8 мг

[00111] Все варианты были подвергнуты ускоренному анализу термостабильности при 45 °C в течение 2 недель в 1 мг/мл фосфатно-солевого буфера (PBS). Потери, агрегацию и фрагментацию мономеров измеряли как до, так и после хранения при высокой температуре с использованием стандартных методов; результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2. Потеря, агрегация или фрагментация мономеров в ускоренном анализе термостабильности для вариантных PD1/TIGIT DuetMab

Название клона	Время удержания мономеров (мин.)	Стартовая чистота после захвата белком А			После хранения при 45 °C в течение 2 недель в 1 мг/мл PBS			Изменение		
		Мономер, %	Агрегация, %	Фрагментация, %	Мономер, %	Агрегация, %	Фрагментация, %	Потеря мономеров, %	Увеличение агрегации, %	Увеличение фрагментации, %
P-VAR1 д. т. DuetMab	9,2	100,0	0,0	0,0	97,6	0,0	2,4	2,4	0,0	2,4
VAR1 VL GL (CDRL1 M- I) + VH GL DuetMab	9,2	100,0	0,0	0,0	97,8	0,0	2,2	2,2	0,0	2,2
VL GL + VH GL DuetMab	9,2	100,0	0,0	0,0	98,0	0,2	1,8	2,0	0,2	1,8

[00112] Кинетические параметры антитела к PD1-TIGIT duetMab LO115/P-VAR1(VHWT-VLWT) и VAR1 (LO115/VHGL-VLGL(M-I)) оценивали с помощью ViaCore в соответствии с инструкциями производителя. Эксперименты по связыванию проводили с использованием инструмента BIAcore T200 (BIAcore). Результаты оценки связывания показаны в таблице 3.

Таблица 3. Кинетические параметры антител к PD-1/TIGIT DuetMabs, определенные посредством ViaCore

Лиганд	Образец	Ka (1/Мс)	Kd (1/с)	KD (M)	X ² (хи-квадрат) (RU ²)
huTIGIT	P-VAR1	4,67E + 06	4,64E-05	9,9E-12	0,0119
huTIGIT	VAR1	4,37E + 06	6,57E-05	15,0E-12	0,0150
cyTIGIT	P-VAR1	1,03E + 06	3,29E-02	32,1E-9	0,7350
cyTIGIT	VAR1	9,99E + 05	4,11E-02	41,1E-9	1,3400
muTIGIT	P-VAR1	1,66E + 06	3,78E-03	2,3E-9	0,1350
muTIGIT	VAR1	2,17E + 06	6,31E-03	2,9E-9	0,0285

Пример 2. Биспецифически связывающиеся с PD-1/TIGIT белки и характеристика связывающихся белков

[00113] Биспецифически связывающийся белок в формате DuetMab, который связывает PD-1 и TIGIT, был создан с использованием последовательностей, представленных в таблице 4 ниже. Области CDR в таблице 4 выделены на основе системы определений Kabat.

Таблица 4. Последовательности AZD2936

PD1 LO115 HCDR1	SEQ ID NO: 1	DYGMH
PD1 LO115 HCDR2	SEQ ID NO: 2	YISSGSYTIYSADSVKG
PD1 LO115 HCDR3	SEQ ID NO: 3	RAPNSFYEYYFDY

PD1 LO115 LCDR1	SEQ ID NO: 4	SASSKHTNLYWSRHMV
PD1 LO115 LCDR2	SEQ ID NO: 5	LTSNRAT
PD1 LO115 LCDR3	SEQ ID NO: 6	QQWSSNPFT
Варибельная область тяжелой цепи PD1 LO115	SEQ ID NO: 7	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGL EWVAYISSGSYTIYSADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCARRAPNSFYEYYFDYWGQGTITVTVSS
Тяжелая цепь «с впадиной» PD1 LO115	SEQ ID NO: 8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGL EWVAYISSGSYTIYSADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCARRAPNSFYEYYFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWKYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPASIEKTIKAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDK SRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
Варибельная область легкой цепи PD1 LO115	SEQ ID NO: 9	QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSKHTNLYWSRHMVWYQQKPG QAPRLLIYLTSNRATGIPARFSGSGGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQ WSSNPFTFGQGTKLEIK
Легкая каппа- цепь WT PD1 LO115	SEQ ID NO: 10	QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSKHTNLYWSRHMVWYQQKPG QAPRLLIYLTSNRATGIPARFSGSGGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQ WSSNPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
TIGIT VAR1 HCDR1	SEQ ID NO: 11	SYAMH
TIGIT VAR1 HCDR2	SEQ ID NO: 12	VISYAGEVKYYADSVKG
TIGIT VAR1 HCDR3	SEQ ID NO: 13	DPLPLHYYGMDV
TIGIT VAR1 LCDR1	SEQ ID NO: 14	SGSSSNIGRRPVN
TIGIT VAR1 LCDR2	SEQ ID NO: 15	SQNQRPS
TIGIT VAR1 LCDR3	SEQ ID NO: 16	AVWDDIGRVLQ

Варибельная область тяжелой цепи в TIGIT VAR1	SEQ ID NO: 17	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGL EWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCARDPLPLHYYGMDVWVGQGTTVTVSS
Тяжелая цепь «с выступом» в TIGIT VAR1	SEQ ID NO: 18	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGL EWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCARDPLPLHYYGMDVWVGQGTTVTVSSASTKGPSVCPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSVDKTHTC PPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPASIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSL WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
Варибельная область легкой цепи в TIGIT VAR1	SEQ ID NO: 19	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGRRPVNWWYQQLPGTAPKLL IYSQNQRPSGVPDRFSGSQSGTSASLAISGLQSEDEADYFCAVWDDIG RVLQLGGGTQLTVL
Сконструированная легкая лямбда-цепь в TIGIT VAR1	SEQ ID NO: 20	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGRRPVNWWYQQLPGTAPKLL IYSQNQRPSGVPDRFSGSQSGTSASLAISGLQSEDEADYFCAVWDDIG RVLQLGGGTQLTVLQPKAAPSVTLPFPCSEELQANKATLVCLISDF YPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPPSKQSNKYAASSYLSLTPEQW KSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEVS
Варибельная область тяжелой цепи PD1 LO115	SEQ ID NO: 21	GAGGTGCAGCTGGTGAATCCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGG CGGCTCCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCTCCGGCTTCACATTCTCC GACTACGGCATGCACTGGGTCCGACAGGCCCTGGAAAGGGCCT GGAATGGGTGGCCTACATCTCCTCCGGCTCCTACACCATCTACTC CGCCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGGACAACGC CAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGG ACACAGCCGTGTACTIONTGTGCCAGACGGGCCCTAACTCCTTCT ACGAGTACTACTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACC GTGTCTCT
Тяжелая цепь «с впадиной» PD1 LO115	SEQ ID NO: 22	GAGGTGCAGCTGGTGAATCCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGG CGGCTCCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCTCCGGCTTCACATTCTCC GACTACGGCATGCACTGGGTCCGACAGGCCCTGGAAAGGGCCT GGAATGGGTGGCCTACATCTCCTCCGGCTCCTACACCATCTACTC CGCCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGGACAACGC CAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGG ACACAGCCGTGTACTIONTGTGCCAGACGGGCCCTAACTCCTTCT ACGAGTACTACTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACC GTGTCTCTGCTAGCACCAAAGGTCCGAGCGTTTTTCCGCTGGCA CCGAGCAGCAAAAGCACCTCTGGTGGCACCCGACACTGGGTG TCTGGTGAAGATTATTTCCGGAACCGGTTACCGTTTCTTGGAA TAGCGGTGCACTGACCAGCGGTGTTACATACCTTTCCGGCAGTTCT GCAGAGCAGCGGTCTGTATAGCCTGTCTAGCGTTGTTACCGTTCC GAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTATATTTGCAATGTGAATCA TAAACCGAGCAATACAAAAGTTGATAAACGCGTTGAACCGAAAA GCTGTGACAAAACCTCACACGTGCCACCGTGCCAGCACCTGAGT TCGAGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGG ACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGG TGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGA

		GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGT CCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGG TCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCAGCATCGAGAAAACCATCTCCA AAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTCTGCACCCTGCC CCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGAGCTG CGCGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG AGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACAAGACCACGCCTCCC GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCGTTAGCAAGTCCACC GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC TCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA
Варибельная область легкой цепи PD1 LO115	SEQ ID NO: 23	CAGATCGTGTGACCCAGTCCCCTGCCACCCTGTCCCTGAGCCCT GGCGAGAGAGCCACCCTGAGCTGCTCCGCCTCCTCCAAGCACACC AACCTGTACTGGTCCCAGCACATGTACTGGTATCAGCAGAAGCCC GGCCAGGCCCTCGGCTGCTGATCTACCTGACCTCTAACCGGGCC ACCGGCATCCCTGCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCGAC TTCACCCTGACCATCTCCAGCCTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTG TACTACTGCCAGCAGTGGTCTCCAACCCCTTACCTTCGGCCAG GGCACCAGCTGGAATCAAG
Легкая капша- цепь WT PD1 LO115	SEQ ID NO: 24	CAGATCGTGTGACCCAGTCCCCTGCCACCCTGTCCCTGAGCCCT GGCGAGAGAGCCACCCTGAGCTGCTCCGCCTCCTCCAAGCACACC AACCTGTACTGGTCCCAGCACATGTACTGGTATCAGCAGAAGCCC GGCCAGGCCCTCGGCTGCTGATCTACCTGACCTCTAACCGGGCC ACCGGCATCCCTGCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCGAC TTCACCCTGACCATCTCCAGCCTGGAACCCGAGGACTTCGCCGTG TACTACTGCCAGCAGTGGTCTCCAACCCCTTACCTTCGGCCAG GGCACCAGCTGGAATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGT CTTCACTTCCCAGCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGC CTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAA AGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCAATCGGGTAACTCCC AGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGC CTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACA CAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCC CGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG
Варибельная область тяжелой цепи в TIGIT VAR1	SEQ ID NO: 25	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCGTGGTCCAGCCTGG GAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAG TAGCTATGCTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCT GGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGCGGGGGAGGTGAAATACT ACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATT CCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAG GACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGACCCGCTACCGCTACAT TACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGT CTCCTCA
Тяжелая цепь «с выступом» в TIGIT VAR1	SEQ ID NO: 26	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCGTGGTCCAGCCTGG GAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAG TAGCTATGCTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCT GGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGCGGGGGAGGTGAAATACT ACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATT CCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAG GACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGACCCGCTACCGCTACAT TACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGT CTCCTCAGCGTCGACCAAAGGTCCGAGCGTGTGCCCGCTGGCACC GAGCAGCAAAGCACCTCTGGTGGCACCAGCAGCACTGGGTTGTC TGGTGAAGATTATTTCCGGAACCGGTTACCGTTTCTGGAATA GCGGTGCACTGACCAGCGGTGTTACATACCTTCCGGCTAGCTGC AGAGCAGCGGTCTGTATAGCCTGTCTAGCGTTGTTACCGTTCCGA GCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTATATTTGCAATGTGAATCATA

		<p>AACCGAGCAATACCAAAGTTGATAAACGCGTTGAACCGAAAAGC GTGGACAAAACCTCACACGTGCCACCGTGCCACAGCAGCTGAGTTC GAGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCAAGGAC ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTG GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCC TGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTC TCCAACAAAGCCCTCCCAGCCAGCATCGAGAAAACCATCTCAA AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTCTACACCCTGCCCC CATGCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACAGCTGTGGTGC CTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGT GCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGT GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCG TGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCTTA AGCCTGTCTCCGGGTAATGA</p>
Варибельная область легкой цепи в TIGIT VARI	SEQ ID NO: 27	<p>CAGTCTGTGCTGACTCAGCCTCCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGG CAGAGGGTACCATCTCTTGTCTGGAAGCAGCTCCAATATCGGA AGGAGGCCTGTAACCTGGTACCAGCAGCTCCAGGAACGGCCCC CAAACCTCTCATCTATAGTCAGAATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCC TGACCGATTCTCTGGCTCCCAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGC CATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTTCTGTGC AGTTTGGGATGACATCGGCCGCTCCTGCAGTTAGGCGGAGGCA CCCAGCTGACCGTCTA</p>
Сконструированная легкая лямбда-цепь в TIGIT VARI	SEQ ID NO: 28	<p>CAGTCTGTGCTGACTCAGCCTCCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGG CAGAGGGTACCATCTCTTGTCTGGAAGCAGCTCCAATATCGGA AGGAGGCCTGTAACCTGGTACCAGCAGCTCCAGGAACGGCCCC CAAACCTCTCATCTATAGTCAGAATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCC TGACCGATTCTCTGGCTCCCAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGC CATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTTCTGTGC AGTTTGGGATGACATCGGCCGCTCCTGCAGTTAGGCGGAGGCA CCCAGCTGACCGTCTAGGTGAGCCCAAGGCGGCCCTCGGTCA CTCTGTTCCCGCCCTGCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCA CACTGGTGTGTCTATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAG TGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAG ACCACCACACCTCCAAACAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAG CAGCTACCTGAGCCTGACGCTGAGCAGTGGAAGTCCACAGAA GCTACAGCTGCCAGGTACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAG ACAGTGGCCCCCTACAGAAGTGCATGA</p>

Исследование параллельного связывания

[00114] Исследования параллельного связывания рекомбинантных белков PD-1 и TIGIT человека измеряли методом интерферометрии биослоев на приборе Octet384 (ForteBio, г. Фримонт, штат Калифорния, США). Биотинилированный человеческий белок TIGIT в концентрации 0,5 мкг/мл в аналитическом буфере [PBS, pH 7,2, 3 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (BSA), 0,05% (об./об.) Tween 20] улавливали на стрептавидиновых (SA) биосенсорах (ForteBio, г. Фримонт, штат Калифорния, США), как показано на ФИГ. 8А. Человеческий белок PD-1 в концентрации 5 мкг/мл в аналитическом буфере улавливали биосенсорами на основе комплекса «никель-нитрилотриуксусная кислота» (Ni-NTA) (ForteBio, г. Фримонт, штат Калифорния), как показано на ФИГ. 8В. После стадии промывки для удаления любого несвязанного белка соответствующие загруженные биосенсоры подвергали последовательному ассоциированию и диссоциированию, сначала со 133 нМ AZD2936, а впоследствии — с человеческими антигенами PD-1 или TIGIT — 300 нМ. Кривые ассоциации и диссоциации рассчитывали на основе нелинейной аппроксимации данных с использованием программного обеспечения Octet384 v.9.0. Способность AZD2936 одновременно связывать рекомбинантные человеческие белки PD-1 и TIGIT определяли с помощью анализа посредством Octet. Как показано на ФИГ. 8А и 8В, AZD2936 продемонстрировал одновременное связывание с человеческими антигенами TIGIT и PD-1

Пример 3. Анализы клеточного связывания

[00115] Связывание AZD2936 тестировали на PD1 и TIGIT, экспрессируемых на клеточной поверхности, по сравнению с показателями моноспецифических антител к PD1 (LO115) и антител к TIGIT (VAR1), а также изотипического контроля, как показано на ФИГ. 9А–9С. В частности, были проведены клеточные анализы равновесного связывания для измерения кажущейся аффинности связывания AZD2936 с человеческими рецепторами PD-1 и TIGIT, экспрессируемыми на клеточной поверхности сконструированных клеточных линий. С этой целью были созданы клеточные линии Jurkat, экспрессирующие человеческие рецепторы PD-1

и/или TIGIT. Чтобы определить, релевантны ли эти клеточные подмножества для оценки связывания AZD2936, определяли плотность человеческих рецепторов клеточной поверхности PD-1 и TIGIT. Как показано в таблице 5, плотность рецепторов PD-1 на положительных клетках Jurkat PD-1+TIGIT- определяли на уровне 11 700 (ст. откл. \pm 6690) рецепторов/клетку, а плотность рецепторов TIGIT на положительных клетках Jurkat PD-1-TIGIT+ определяли на уровне 147 000 (ст. откл. \pm 91 500) рецепторов/клетка. Плотность рецепторов PD-1 и TIGIT на дважды положительных клетках Jurkat PD 1+TIGIT+ составляла 621 000 (ст. откл. \pm 210 000) и 149 000 (ст. откл. \pm 89 100), что демонстрирует превышение количества рецепторов PD-1 над количеством рецепторов TIGIT в соотношении 4,17 : 1.

Таблица 5. Плотность рецепторов PD-1 и TIGIT на поверхности клеток сконструированных клеточных линий Jurkat, n = 4

Клеточная линия	PD-1 (рецепторы/клетка, среднее \pm ст. откл.)	TIGIT (рецепторы/клетка, среднее \pm ст. откл.)	PD-1 / TIGIT (соотношение)
Jurkat PD-1 ⁺ TIGIT ⁻	11700 (\pm 6690)	Н/О	Н/О
Jurkat PD-1 ⁻ TIGIT ⁺	Н/О	147 000 (\pm 91 500)	Н/О
Jurkat PD-1 ⁺ TIGIT ⁺	621 000 (\pm 210 000)	149 000 (\pm 89 100)	4,17

Н/О = не определено; PD-1 = белок запрограммированной клеточной смерти 1; TIGIT = Т-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и иммунорецепторного ингибирующего мотива на основе тирозина. Ст. откл. = стандартное отклонение.

[00116] Связывание AZD2936 оценивали вместе с двухвалентными mAb с использованием 3 клеточных линий Jurkat, сконструированных для экспрессии человеческого рецептора PD-1 и/или человеческого рецептора TIGIT. AZD2936 связывался с клетками Jurkat PD-1-TIGIT+ зависимым от концентрации образом и сохранял свойства клеточного связывания mAb антитела к TIGIT с рецепторами TIGIT (ФИГ. 9А). По сравнению с бивалентным антителом к TIGIT, AZD2936 продемонстрировал увеличение (в 2,85 раза) значений EC₅₀ относительно связывания (таблица 6) и увеличение максимального уровня связывания (ФИГ. 9А). AZD2936 связывался с клетками Jurkat PD-1+TIGIT- зависимым от концентрации образом. По сравнению с бивалентным антителом к PD-1 AZD2936

продemonстрировал повышенные (в 4,82 раза) значения связывания EC₅₀ в отношении связывания с клетками PD-1+TIGIT-Jurkat (таблица 7), а также увеличение максимального уровня связывания (ФИГ. 9B). Эти результаты продемонстрировали, что моновалентного связывания достаточно для взаимодействия с TIGIT или PD-1 на клетках Jurkat.

Таблица 6. AZD2936 и активность связывания антител к TIGIT с TIGIT на клетках Jurkat TIGIT⁺

	Эксперимент № 1	Эксперимент № 2	Среднее значение EC ₅₀ (нМ)	Кратное изменение уровня связывания по сравнению с антителом к TIGIT
	EC ₅₀ (нМ)	EC ₅₀ (нМ)		
AZD2936	0,303	0,375	0,339	2,85
Антитело к TIGIT	0,092	0,147	0,119	1,00

Таблица 7. AZD2936 и активность связывания антитела к PD-1 с PD-1⁺ на клетках Jurkat

	Эксперимент № 1	Эксперимент № 2	Среднее значение EC ₅₀ (нМ)	Кратное изменение уровня по сравнению с антителом к PD-1
	EC ₅₀ (нМ)	EC ₅₀ (нМ)		
AZD2936	0,944	5,490	3,217	4,82
Антитело к PD-1	0,349	0,985	0,667	1,00

Таблица 8. Активность связывания AZD2936 с клетками Jurkat PD-1⁺TIGIT⁻, PD-1⁻TIGIT⁺ и PD-1⁺TIGIT⁺

	Эксперимент № 1	Эксперимент № 2	Среднее значение EC ₅₀ (нМ)
	EC ₅₀ (нМ)	EC ₅₀ (нМ)	
PD-1 ⁺ TIGIT ⁺ Jurkat	0,495	0,769	0,632
PD-1 ⁻ TIGIT ⁺ Jurkat	0,282	0,346	0,314
PD-1 ⁺ TIGIT ⁻ Jurkat	0,584	1,01	0,797

[00117] Свойства клеточного связывания AZD2936 с клеточными линиями Jurkat, экспрессирующими либо PD-1 (PD-1⁺TIGIT⁻), либо TIGIT (PD-1⁻TIGIT⁺), либо оба рецептора (PD-1⁺TIGIT⁺), определяли посредством анализа связывания методом проточной цитометрии. Как показано на ФИГ. 9С, AZD2936 связывается со всеми тремя типами клеток Jurkat, при этом обладает схожими свойствами клеточного связывания. Для определения разницы в уровнях аффинности связывания AZD2936 при взаимодействии с тремя клеточными линиями определяли значения EC₅₀ (таблица 8). Среднее значение EC₅₀ у AZD2936 при взаимодействии с клеточной линией, экспрессирующей только PD-1, составляло 0,797 нМ. Среднее значение EC₅₀ у AZD2936 при взаимодействии с клеточной линией с двойной экспрессией (TIGIT⁺PD-1⁺) составляло 0,632 нМ. Связывание с клеточной линией, сконструированной для экспрессии только TIGIT-рецепторов, продемонстрировало самое низкое среднее значение EC₅₀, равное 0,314 нМ.

Репортерные анализы на основе NFAT-люциферазы при сокультивировании двух видов клеток

[00118] AZD2936 тестировали в сравнении с моноспецифическим антителом к PD1 (LO115), моноспецифическим антителом к TIGIT (VAR1) и изотипического контролем, как показано на ФИГ. 10А–10С. Было показано, что AZD2936 активен и обладает более сильной лиганд-блокирующей активностью как в отношении PD-1, так и в отношении TIGIT, по сравнению с моноспецифическими антителами. В частности, для оценки способности AZD2936 блокировать взаимодействия PD-1/PD-L1 и/или TIGIT/CD155 применяли анализы биоактивности на основе сокультивирования двух видов клеток с использованием клеток CHO-K1, генетически сконструированных для экспрессии scFv антител CD3 ОКТ3, PD-L1 и CD155, а также репортерных Т-клеток NFAT-люциферазы Jurkat, генетически сконструированных для экспрессии человеческого PD-1, человеческого TIGIT или обоих антигенов. В анализе активность люциферазы под контролем элементов ответа NFAT измеряли в ответ на стимуляцию ОКТ3-антителом. Передача сигналов

NFAT происходит после передачи TCR-сигналов и, как сообщается, коррелирует с другими показателями активации Т-клеток, такими как пролиферация и высвобождение цитокинов. Полная блокада взаимодействий PD-1/PD-L1 и/или TIGIT/CD155 способствовала максимальному агонизму TCR и последующей активности люциферазы.

[00119] Активность AZD2936 по блокированию взаимодействий PD-1/PD-L1 тестировали в анализе совместной культуры двух видов клеток: CHO-K1 ОКТ3 PD-L1 CD155 клеток и репортерных Т-клеток NFAT-люцифераза PD-1⁺TIGIT⁻ Jurkat. AZD2936 продемонстрировал зависящую от концентрации активность в двух повторяющихся экспериментах со средним значением EC50, равным 4,26 нМ (значение EC50 составляло 4,70 и 3,83 нМ в экспериментах № 1 и №2 соответственно) (ФИГ. 10А и таблица 9). В том же анализе средние значения EC50 для антитела к PD-1 составляли 3,03 нМ (значения EC50 составляли 1,93 и 4,14 нМ в экспериментах № 1 и № 2 соответственно). Ни антитело к TIGIT, ни антитело изотипического контроля в этом анализе не проявили активности.

[00120] Тестировали активность AZD2936 по блокированию взаимодействий TIGIT/CD155. В этом анализе клетки CD155 aAPC/CHO-K1 совместно культивировали с репортерными клетками NFAT-люцифераза Jurkat PD-1⁻TIGIT⁺ и сравнивали уровни активности люциферазы, индуцированные после обработки с помощью AZD2936, mAb антитела к TIGIT и контрольного изотипического mAb. В этом анализе AZD2936 продемонстрировал повышенную активность по сравнению с изотипическим контрольным антителом, причем среднее значение EC50 по результатам двух экспериментов составило 15,3 нМ (значения EC50 составили 17,0 нМ и 13,7 нМ в экспериментах № 1 и № 2 соответственно) (ФИГ. 10В и таблица 10). В одном и том же эксперименте обработка антителом TIGIT привела к получению среднего значения EC50, равного 2,22 нМ, по результатам двух экспериментов (значения EC50 составили 1,59 и 2,85 нМ в экспериментах № 1 и № 2 соответственно).

[00121] Активность AZD2936 по блокированию взаимодействий PD-1/PD-L1 и TIGIT/CD155 тестировали с помощью анализа с клетками CHO-K1 OKT3 PD-L1 CD155 и репортерными Т-клетками NFAT-люцифераза PD-1⁺TIGIT⁺ Jurkat. AZD2936 продемонстрировал активность в двух повторных экспериментах со средним значением EC₅₀ равным 5,82 нМ (значения EC₅₀ в двух отдельных экспериментах составили 5,57 и 6,07 нМ) (ФИГ. 10С и таблица 11).

Таблица 9. Биологическая активность AZD2936 и антитела к PD-1, определенная в репортерных анализах на основе NFAT-люциферазы при сокультивировании двух типов клеток с использованием человеческих Т-клеток Jurkat PD-1⁺TIGIT⁻

	Эксперимент № 1	Эксперимент № 2	Среднее значение EC ₅₀ (нМ)	Кратное изменение среднего значения EC ₅₀ по сравнению с антителом PD-1
	EC ₅₀ (нМ)	EC ₅₀ (нМ)		
AZD2936	4,70	3,83	4,26	1,40
Антитело к PD-1	1,93	4,14	3,03	1,00

EC₅₀ = полумаксимальная эффективная концентрация; NFAT = ядерный фактор активированных Т-клеток; PD-1 = белок запрограммированной клеточной смерти 1; TIGIT = Т-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и иммунорецепторного ингибирующего мотива на основе тирозина. Значение EC₅₀ получали на основе средних значений, взятых из результатов 3 повторов.

Таблица 10. Биологическая активность AZD2936 и антител к TIGIT, определенная в репортерных анализах на основе NFAT-люциферазы при сокультивировании двух типов клеток с использованием человеческих Т-клеток Jurkat PD-1⁻TIGIT⁺

	Эксперимент № 1	Эксперимент № 2	Среднее значение EC ₅₀ (нМ)	Кратное изменение среднего значения EC ₅₀ по сравнению с антителом TIGIT
	EC ₅₀ (нМ)	EC ₅₀ (нМ)		
AZD2936	17,0	13,7	15,3	6,89
Антитело к TIGIT	1,59	2,85	2,22	1,00

EC₅₀ = полумаксимальная эффективная концентрация; NFAT = ядерный фактор активированных Т-клеток; PD-1 = белок запрограммированной клеточной смерти 1; TIGIT = Т-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и иммунорецепторного ингибирующего мотива на основе тирозина.

Значение EC₅₀ получали на основе средних значений, взятых из результатов 3 повторов.

Таблица 11. Биологическая активность AZD2936 и комбинации антител к PD-1 и к TIGIT, определенная в репортерных анализах на основе NFAT-люциферазы при сокультивировании двух типов клеток с использованием человеческих Т-клеток Jurkat PD-1⁺TIGIT⁺

	Эксперимент № 1	Эксперимент № 2	Среднее значение EC ₅₀ (нМ)	Кратное изменение среднего значения EC ₅₀ по сравнению с комбинацией антител к TIGIT и к PD-1
	EC ₅₀ (нМ)	EC ₅₀ (нМ)		
AZD2936	5,57	6,07	5,82	0,93
Комбинация антител к TIGIT и антител к PD-1	6,09	6,45	6,27	1,00

EC₅₀ = полумаксимальная эффективная концентрация; NFAT = ядерный фактор активированных Т-клеток; PD-1 = белок запрограммированной клеточной смерти 1; TIGIT = Т-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и иммунорецепторного ингибирующего мотива на основе тирозина. EC₅₀ рассчитана по средним значениям, полученным в 3 повторах

Пример 4. Анализ киллинга опухолевых клеток OE21

[00122] Способность AZD2936 уничтожать опухолевые клетки OE21 оценивали в системе анализа *in vitro*. В данном разделе используются следующие сокращения: ANOVA = дисперсионный анализ; CMV = цитомегаловирус; EBV = вирус Эпштейна — Барр; ELISA = фермент-связанное иммуносорбентное исследование; IFN- γ = интерферон- γ ; НЗ = не значимый; OE21-VP = клеточная линия

плоскоклеточного рака пищевода человека европеоидной расы, модифицированная для экспрессирования вирусных пептидов (VP); PBMС = мононуклеарные клетки периферической крови; PD-1 = белок запрограммированной клеточной смерти 1; TIGIT = Т-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и иммунорецепторного ингибирующего мотива на основе тирозина.

Система совместного культивирования сингенных по HLA-антигенам антиген-специфичных Т-клеток и опухолевых клеток и получение линий опухолевых клеток OE21 со стабильной экспрессией вирусных пептидных антигенов

[00123] Для оценки *in vitro* активности и эффективности AZD2936 для опосредованного Т-клетками уничтожения опухолевых клеток получали модель совместного культивирования сингенных по HLA-антигенам антиген-специфичных Т-клеток и опухолевых клеток. Положительную по HLA-A*02:01 клеточную линию плоскоклеточного рака пищевода человека, OE21, модифицировали для экспрессирования шести вирусных антигенных пептидов с известным связыванием HLA-A*02:01 (OE21-VP). Используемые шесть вирусных пептидов представляли собой пептиды вируса Эпштейна — Барр человека LMP2 356–364 (аминокислотная последовательность FLYALALLL; SEQ ID NO:29), LMP2 426–434 (аминокислотная последовательность CLGGLLTMV; SEQ ID NO:30), BMLF1 280–288 (аминокислотная последовательность GLCTLVAML; SEQ ID NO:31); гриппа M1 58–66 (аминокислотная последовательность GILGFVFTL; SEQ ID NO:32), гриппа А PA46–54 (аминокислотная последовательность FMYSDFHFI; SEQ ID NO:33); и цитомегаловируса pp65 495-503 (аминокислотная последовательность NLVPMVATV; SEQ ID NO:34). Трансген, кодирующий вирусные пептиды и кассеты GFP репортера, активируемый конститутивным промотором убиквитина-С человека, получали генным синтезом (GeneArt™, г. Плезантон, штат Калифорния, США). Трансгены вставляли в лентивирусные экспрессионные векторы с использованием стандартных методик молекулярной биологии. Подтвержденные секвенированием

трансгенные конструкторы впоследствии использовали для получения лентивирусных частиц из клеток продуцирующей линии HEK293FT (Life Technologies, г. Гранд-Айленд, штат Нью-Йорк, США) с использованием набора для упаковки ВИЧ лентивекторов «pRACKN1 HIV Lentivector Packaging Kit» (Systems Bioscience, г. Пало-Алто, штат Калифорния, США), следуя инструкциям производителя. Одноклеточные клональные линии с высоким уровнем экспрессирования трансгена выбирали с использованием сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS) для выделения GFP⁺ клеток, и линии клеток с однородными профилями экспрессии трансгена отбирали в библиотеку и прогрессировали для дальнейшей характеристики.

Размножение специфичных к пептидам GLCTLVAML (SEQ ID NO:31) и NLVPMVATV (SEQ ID NO:34) Т-клеток от положительных по HLA-A*02:01 здоровых доноров

[00124] Проводили скрининг мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) от положительных по HLA-A*02:01 здоровых доноров на реакционную способность в отношении пептида EBV BMLF1 280–288 (GLCTLVAML) и пептида CMV pp65 495-503 (NLVPMVATV) с использованием проточной цитометрии для маркеров активации. Вкратце, PBMC обрабатывали 1 мкг/мл пептида и 55 Международных единиц (МЕ)/мл IL-2 в течение семи дней, затем окрашивали флуоресцентно-конъюгированными антителами к CD3, CD8, CD25 и TIM3 оценивали на связывание с использованием проточной цитометрии. Доноров идентифицировали как EBV- или CMV-реакционных, если > 10% CD3+CD8⁺ Т-клеток давали положительный результат окрашивания одновременно на CD25 и TIM-3.

[00125] Реакционные к пептиду EBV BMLF1 280–288 или пептиду CMV pp65 495–503 PBMC выделяли из крови здоровых доноров (положительных по HLA A*02:01) с использованием автоматизированного разделителя клеток RoboSepTM-S (StemCell Technologies, г. Кембридж, штат Массачусетс, США) в комбинации с набором для прямого выделения PBMC человека EasySepTM Direct Human PBMC isolation kit (StemCell Technologies), следуя инструкциям производителя. Как показано

на ФИГ. 1В, выделенные PBMC впоследствии ресуспендировали в концентрации $1,5 \times 10^7$ клеток/мл в смеси 1 : 1 полной культуральной среды RPMI, содержащей среды RPMI-1640™ (Gibco) и AIM-V™ (Gibco), 5% сыворотки человека HI (Sigma Aldrich), 100 Ед/мл пенициллина (Gibco) и 100 мкг/мл стрептомицина (Gibco), в присутствии 1 мкг/мл пептида (MBL International Corporation) и 55 МЕ/мл рекомбинантного IL-2 человека (PeproTech) в течение получаса с последующим культивированием в планшете G-Rex6® Well Plate (Wilson Wolf Corporation) в 40 мл среды IL-2 на лунку в течение 7 дней при 37 °C, 5% CO₂ с дальнейшим анализом.

Анализ специфичных к пептидам GLCTLVAML (SEQ ID NO:31) и NLVPMVATV (SEQ ID NO:34) CD8+ Т-клеток

[00126] Для количественного определения антиген-специфичных CD8+ Т-клеток размноженные PBMC анализировали методом проточной цитометрии с использованием анализатора LSR II® (BD Biosciences). После размножения PBMC промывали буфером для FACS (PBS pH 7,2 (Gibco), 2% PBS (Gibco) и 2 мМ EDTA (Gibco)) и инкубировали с флуоресцентно-меченым HLA-A*02:01/GLCTLVAML или HLA-A*02:01/NLVPMVATV декстрамером (ImmuDex™) в течение 30 минут при комнатной температуре. PBMC параллельно дополнительно окрашивали флуоресцентно-мечеными антителами к CD3 (клон HIT3a, Biolegend), антителами к CD8 (клон HIT8A, Biolegend), PD-1 (клон EH12.2H7, Biolegend) и антителами к TIGIT (клон A15153G, Biolegend™) для различения разных клеточных популяций. После двукратной промывки буфером для FACS клетки анализировали методом проточной цитометрии для выявления связавшихся антител. Количество связавшихся с поверхностью клетки антител определяли с помощью ПО FACSDiva™ (BD Biosciences). Анализ данных проводили с использованием ПО FlowJo™ (BD Biosciences). Процентную долю антиген-специфичных CD8+ Т-клеток (селекция по одиночным клеткам, без дедбриса, CD3+, CD8+ и положительным по GLCTLVAML или NLVPMVATV декстрамеру) после размножения определяли с использованием следующей формулы:

Общее число антиген-специфичных CD8⁺ Т-клеток = $A \times (B/100)$;
[00127] где A — общее число собранных клеток, а B — % одиночных, без дебриса, CD3⁺CD8⁺ Т-клеток, положительных по декстрамеру.

Анализ Т-клеточного киллинга

[00128] Для измерения способности AZD2936 модифицировать уничтожение опухолевых клеток антиген-специфичными CD8⁺ Т-клетками разработали аналитическую систему с совместным культивированием. Лизис опухолевых клеток оценивали с использованием платформы клеточного анализа в реальном времени Agilent xCELLigence RTCA[®], в которой в качестве индикатора гибели опухолевых клеток используется потеря клеточного импеданса (Oberg et al., Front Immunol. 2014;5:643). Вкратце, клетки OE21-VP собирали из культуральных колб трипсином, однократно промывали полной культуральной средой RPMI[™], ресуспендировали в полной среде RPMI[™] и добавляли в каждую лунку 96-луночных планшетов для проведения клеточного анализа в реальном времени RTCA E-Plate[®] в количестве 10 000 клеток на лунку. Опухолевые клетки культивировали в планшетах E-Plate[®] в течение 24 часов при 37 °С в среде с 5% CO₂, следуя рекомендациям производителя. В лунки добавляли исследуемые и контрольные препараты и немедленно добавляли пептид-специфичные CD8⁺ Т-клетки с оптимизированными соотношениями эффектор — мишень (E : T), которые определяли заранее для каждой популяции донорских CD8⁺ Т-клеток, используемой в данном исследовании (в соотношении 2 : 1 эффекторных Т-клеток к опухолевым клеткам-мишеням). Гибель опухолевых клеток и процент цитолиза контролировали на временном интервале 3–8 дней после добавления Т-клеток (в зависимости от донора), численные величины рассчитывали с использованием ПО RTCA Pro[®], следуя рекомендациям производителя.

Анализ величин EC50

[00129] Потерю клеточного импеданса рассчитывали в ПО RTCA PRO[®] (Agilent), которым измеряли клеточный импеданс в реальном времени как маркер уничтожения опухолевых клеток. Определяли площадь под кривой зависимости цитолиза от времени (цитоллиз * час) и строили график для расчета величин EC50 в ПО Prism Software[®] (GraphPad Software, г. Сан-Диего, штат Калифорния, США) для совместных культур исследуемых и контрольных препаратов при концентрациях в диапазоне от 0,0001 нМ до 10 нМ в сравнении с совместными культурами только Т-клеток без добавления исследуемых или контрольных препаратов (эффект исходного уровня). Импеданс непрерывно измеряли каждые 10 минут до завершения исследования, которое наступило через 6 дней после добавления Т-клеток.

Измерение концентраций IFN- γ в супернатантах совместных культур

[00130] Для оценки количества IFN- γ , обнаруживаемого в супернатантах совместных культур, содержащих опухолевые клетки OE21-VP и реакционные CD8+ Т-клетки, параллельно планшетам xCELLigence[®] RTCA E-Plate[®] готовили отдельные совместные культуры в 96-луночных планшетах Nunc (Sigma Aldrich). Для оценки выделения IFN- γ собирали супернатанты совместных культур в 96-луночных планшетах Nunc спустя двадцать четыре часа. Сравнение уровней IFN- γ проводили при концентрации 200 пМ исследуемых и контрольных препаратов. IFN- γ измеряли с использованием технологии мультиплексного ELISA компании Mesoscale Discovery для определения IFN- γ человека, следуя рекомендациям производителя.

Статистические методы

[00131] Для цитолиза и выделения IFN- γ статистический анализ проводили в ПО Prism[®], версия 8.0.1 для Windows[®] (GraphPad Software, г. Сан-Диего, штат Калифорния, США). Проводили однофакторный дисперсионный анализ, предполагая сферичность (равная изменчивость разностей) и используя критерий множественного сравнения Тьюки. Величины EC50 моделировали нелинейной подгоночной кривой,

используя зависимость логарифма дозы от нормализованного отклика. Для оценки различий в величинах EC50 между группами обработки AZD2936 и антител к PD-1 величины EC50 логарифмировали, средние по группам сравнивали с использованием двустороннего непарного t-теста Стьюдента и оценивали в предположении неравных дисперсий для двух групп. Величины p на каждом рисунке указаны как не значимые (НЗ) $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

[00132] Положительные по CD8 Т-клетки собирали у пяти здоровых людей-доноров и объединяли. Первичные РВМС человека, размноженные с пептидом EBV или CMV, совместно культивировали с исследуемыми и контрольными препаратами (0,2 нМ изотипического контроля, 0,2 нМ антитела к PD-1, 0,2 нМ антитела к TIGIT, 0,1 нМ антитела к PD-1 + 0,1 нМ антитела к TIGIT или 0,2 нМ AZD2936) и опухолевыми клетками OE21-VP.

[00133] На ФИГ. 11А показано, что в данном анализе опосредуемого CD8 Т-клетками киллинга опухолевых клеток *in vitro* AZD2936 демонстрирует повышенную активность по сравнению с антителом к PD-1. Как показано на ФИГ. 11А, AZD2936 демонстрирует значительное улучшение в уничтожении опухолевых клеток OE21-VP по сравнению с введением только антитела к PD1.

[00134] При распознавании антигена CD8+ Т-клетки секретируют IFN- γ , цитокин, которые дополнительно стимулирует противоопухолевый иммунный ответ и CD8+ Т-клеточные цитотоксические эффекты (Bhat et al Cell Death Dis., 2017 Jun 1;8(6):e2836). Поэтому оценивали выделение IFN- γ после совместного культивирования пептид-специфичных CD8+ Т-клеток с клетками OE21-VP.

[00135] Первичные РВМС человека, размноженные с пептидом EBV или CMV, совместно культивировали с исследуемыми и контрольными препаратами (0,2 нМ изотипического контроля, 0,2 нМ антитела к PD-1, 0,2 нМ антитела к TIGIT, 0,1 нМ антитела к PD-1 + 0,1 нМ антитела к TIGIT или 0,2 нМ AZD2936) и опухолевыми клетками OE21-VP. Концентрацию IFN- γ в анализе совместного культивирования Т-клеток и опухолевых клеток измеряли в супернатантах, собранных спустя двадцать четыре часа после добавления Т-клеток. Результаты показаны на ФИГ. 11В.

Концентрацию IFN- γ определяли с использованием технологии мультиплексного ELISA компании Mesoscale Discovery для определения IFN- γ человека. Приведены кратности изменения всех величин по сравнению со средним для изотипического контроля. Данные соответствуют 4 отдельным донорам. Статистическую значимость рассчитывали с использованием однофакторного дисперсионного анализа и критерия множественного сравнения Тьюки. Горизонтальные линии показывают внутригрупповые средние арифметические значения. *** — $p < 0,001$, **** — $p < 0,0001$.

[00136] Как показано на ФИГ. 11B, в совместных культурах Т-клеток, выделенных и размноженных из PBMC четырех здоровых доноров, AZD2936 индуцировал статистически значимое увеличение количества IFN- γ в супернатанте совместных культур с опухолевыми клетками по сравнению с изотипическим контролем и антителом к PD-1.

[00137] Анализ киллинга опухолевых клеток *in vitro* также использовали для определения различия в цитотоксичности между AZD2936 и антителом к PD-1. Концентрационное титрование антител от 10 нМ до 0,1 пМ показало, что средняя арифметическая величина EC50 составила $21,9 \pm 3,4$ пМ (ст. откл.) для AZD2936 и $163 \pm 70,6$ пМ (ст. откл.) для антитела к PD 1 (ФИГ. 11D), давая 6,44-кратное увеличение эффективности AZD2936 по сравнению с антителом к PD-1 (ФИГ. 11C).

Пример 5. Мышиные модели ксенотрансплантата опухолевых клеток человека OE21 и PC9-MART1

[00138] Для изучения способности AZD2936 ингибировать рост опухоли использовали модель опухоли OE21 и модель опухоли PC9-MART1 (ФИГ. 12A–12D и 13A–13D соответственно). Активность AZD2936 изучали в мышиных моделях ксенотрансплантата опухолевых клеток человека, используя иммунодефицитных мышей с диабетом без ожирения / тяжелым комбинированным иммунодефицитом (NOD-scid) с нулевым аллелем гена, кодирующего гамма-цепь рецептора IL-2 (NSG). Животных подкожно инокулировали раковыми клеточными

линиями человека, модифицированными для экспрессирования пептидных антигенов, представляемых HLA-A*2:01. В одной модели использовали OE21-VP клеточной линии рака пищевода, модифицированной для экспрессирования вирусных пептидов. В другой модели использовали клетки PC9-MART1, клеточной линии аденокарциномы легкого, модифицированной для экспрессирования антигена меланомы-1.

[00139] Клетки опухолевых линий вводили подкожной инъекцией (п/к) в пах мышей, и после увеличения опухолей до объема приблизительно 200 мм³ каждой мышце делали внутривенную инъекцию Т-клеток человека, специфичных к антигенам, экспрессируемым клетками опухолевых линий. Животные получали первую дозу исследуемых и контрольных препаратов в течение 24 часов после случайного разбиения на группы, и затем получали три дополнительных введения исследуемых и контрольных препаратов.

[00140] Внутривенное введение AZD2936 животным значительно ингибировало рост опухолей по сравнению с активностью его родительского бивалентного антитела к PD-1 (антитело к PD-1), комбинации антитела к TIGIT и антитела к PD-1 и бивалентного изотипического контрольного антитела, нацеленного на посторонний антиген, R347 (изотипический контроль), как показано на ФИГ. 12A–12D и 13A–13D. Лечение AZD2936 ингибировало рост опухоли на всю продолжительность исследования и в двух мышечных моделях ксенотрансплантата с использованием Т-клеток с различными антигенными специфичностями. Противоопухолевая активность AZD2936 проявлялась с использованием специфичных к опухоли Т-клеток, полученных от двух независимых здоровых доноров для каждой из моделей OE21-VP и PC9-MART-1.

Пример 6. Характеризация эффекторной функции для AZD2936

[00141] Клиническая эффективность терапевтических антител основывается на двух типах функциональностей: специфичное связывание с мишенью через Fab-домен и иммуноопосредуемые эффекторные функции через взаимодействие Fc-

домена. Когда антитела IgG связываются с антигенами поверхности клетки через свои Fab-домены, Fc-часть антител может связываться с компонентом комплемента 1q (C1q), первым членом запускаемого антителом классического каскада комплемента, или может взаимодействовать с рецепторами Fc гамма (FcγR), экспрессируемыми на натуральных киллерных и других миелоидных клетках.

[00142] Взаимодействие с C1q запускает каскад комплемента, приводя к формированию мембрано-атакующего комплекса, который уничтожает клетку-мишень посредством разрушения ее клеточной мембраны — процесс, описываемый как комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC). Взаимодействие Fc-домена антитела FcγRIIIa вызывает поперечную сшивку FcγR, что запускает выделение цитотоксичных гранул, содержащих перфорин и гранзимы, приводя к гибели клетки-мишени, связанной с антигенсвязывающим доменом антитела — процесс, называемый антитело-зависимой клеточной цитотоксичностью (ADCC) (Nimmerjahn and Ravetch, *Nature Reviews Immunology*, 8:34–47, 2008). AZD2936 представляет собой моновалентное биспецифическое гуманизированное IgG1 моноклональное антитело, сконструированное для наличия мутаций в своем Fc-домене для ослабления Fc-опосредуемой эффекторной функциональности. Данные мутации в Fc представляют собой тройную мутацию L234F/L235E/P331S. Потенциал AZD2936 в иницировании активности типа CDC и ADCC оценивали с использованием клеточной линии Jurkat, модифицированной для экспрессирования TIGIT и PD-1.

[00143] Процентные доли живых, экспрессирующих PD-1 и TIGIT клеток Jurkat (ФИГ. 14А) или клеток Дауди (ФИГ. 14В) после инкубации с AZD2936, изотипическим контролем IgG1-ТМ, ритуксимабом, или изотипическим контролем IgG1, вместе с содержащей комплемент сывороткой человека или термически инактивированной сывороткой человека оценивали путем добавления реагента Cell-Titer Glo[®]. Cell Titer Glo[®] генерирует люминесцентный сигнал, пропорциональный количеству живых клеток в каждой лунке. Эти результаты показывают, что AZD2936 не запустил процесс CDC в клетках Jurkat PD-1⁺TIGIT⁺ (ФИГ. 14А). Напротив, ритуксимаб, антитело к CD20 с известной активностью CDC, продемонстрировало

зависящие от концентрации эффекты на экспрессирующие CD20 клетки Дауди в присутствии той же сыворотки человека, использованной в анализе с AZD2936, но не в присутствии термически инактивированной контрольной сыворотки (ФИГ. 14B). Изотипический контроль IgG1 не оказал никакого эффекта на долю жизнеспособных клеток для обоих типов клеток. Ни в одном образце с термически инактивированной сывороткой не наблюдалось зависящего от концентрации снижения жизнеспособности клеток, и это подтверждает, что наблюдаемая гибель клеток была опосредована CDC.

[00144] Активность антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) оценивали с использованием PBMC от здоровых доноров в качестве эффекторных клеток и экспрессирующего PD-1 и TIGIT клеточной линии Jurkat в качестве клеток-мишеней. В этом анализе AZD2936 продемонстрировал активность, аналогичную образцам с изотипическим контролем, и вызвал статистически значимое снижение активности в процессе ADCC по сравнению с положительным контролем, ритуксимабом, при использовании в качестве клеток-мишеней экспрессирующих CD20 клеток Дауди, при всех парных концентрациях выше 0,061 нг/мл (ФИГ. 15). Результаты настоящего исследования показывают, что AZD2936 не запускал процессы ADCC или CDC против экспрессирующей PD-1 и TIGIT клеточной линии Jurkat.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Биспецифически связывающийся белок, который специфически связывается с PD-1 и TIGIT, содержащий:

а) первый связывающийся домен, который специфически связывается с PD-1, причем первый связывающийся домен содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и переменный домен легкой цепи, содержащий LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; и

б) второй связывающийся домен, который специфически связывается с TIGIT, при этом второй связывающийся домен содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, и переменный домен легкой цепи, содержащий LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

2. Биспецифически связывающийся белок по п. 1, в котором первый связывающийся домен, который специфически связывается с PD-1, содержит переменный домен тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и переменный домен легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

3. Биспецифически связывающийся белок по п. 1, в котором первый связывающийся домен, который специфически связывается с PD-1, содержит переменный домен тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, которая на по

меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7, и вариабельный домен легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9.

4. Биспецифически связывающийся белок по любому из пп. 1–3, в котором первый связывающийся домен, который специфически связывается с PD-1, содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

5. Биспецифически связывающийся белок по любому из пп. 1–3, в котором первый связывающийся домен, который специфически связывается с PD-1, содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10.

6. Биспецифически связывающийся белок по любому из пп. 1–5, в котором второй связывающийся домен, который специфически связывает TIGIT, содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и вариабельный домен легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

7. Биспецифически связывающийся белок по любому из пп. 1–5, в котором второй связывающийся домен, который специфически связывается с TIGIT, содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17, и вариабельный домен легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 19.

8. Биспецифически связывающийся белок по любому из пп. 1–7, в котором второй связывающийся домен, который специфически связывается с TIGIT, содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.
9. Биспецифически связывающийся белок по любому из пп. 1–7, в котором второй связывающийся домен, который специфически связывается с TIGIT, содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20.
10. Биспецифически связывающийся белок по п. 4, в котором константная область легкой цепи представляет собой каппа-цепь.
11. Биспецифически связывающийся белок по п. 8, в котором константная область легкой цепи представляет собой лямбда-цепь.
12. Биспецифически связывающийся белок по любому из пп. 1–11, причем связывающийся белок представляет собой антитело.
13. Биспецифически связывающийся белок по п. 12, причем антитело представляет собой антитело IgG.
14. Биспецифически связывающийся белок по п. 13, причем антитело представляет собой антитело IgG1.
15. Биспецифически связывающийся белок по п. 13 или 14, причем антитело является человеческим или гуманизированным.

16. Биспецифически связывающийся белок по любому из пп. 1–15, в котором равновесная константа диссоциации (K_D) для взаимодействия «биспецифически связывающийся белок — человеческий TIGIT» менее или равна примерно 15 пМ.
17. Биспецифически связывающийся белок по любому из пп. 1–15, в котором равновесная константа диссоциации (K_D) для взаимодействия «биспецифически связывающийся белок — человеческий TIGIT» менее или равна примерно 9 пМ.
18. Биспецифически связывающийся белок по любому из пп. 1–14, в котором равновесная константа диссоциации (K_D) для взаимодействия «биспецифически связывающийся белок — человеческий TIGIT» составляет от примерно 9 пМ до примерно 15 пМ.
19. Биспецифически связывающийся белок по любому из пп. 1–18, в котором равновесная константа диссоциации (K_D) для взаимодействия «биспецифически связывающийся белок — PD-L1 человека» менее или равна примерно 0,4 пМ.
20. Биспецифически связывающийся белок по любому из пп. 1–19, в котором равновесная константа диссоциации (K_D) для взаимодействия «биспецифически связывающийся белок — PD-L1 человека» составляет от примерно 0,3 пМ до примерно 0,5 пМ.
21. Биспецифически связывающийся белок по любому из пп. 1–20, содержащий вариантную область Fc.
22. Биспецифически связывающийся белок по п. 21, не запускающий комплемент-зависимую цитотоксичность *in vivo*.
23. Биспецифически связывающийся белок по п. 21, имеющий пониженную комплемент-зависимую цитотоксичность по сравнению с биспецифически связывающимся белком, имеющим область Fc дикого типа.

24. Биспецифически связывающийся белок по п. 21, не запускающий антителозависимую клеточную цитотоксичность *in vivo*.

25. Биспецифически связывающийся белок по п. 21, имеющий пониженную антителозависимую клеточную цитотоксичность по сравнению с биспецифически связывающимся белком, имеющим область Fc дикого типа.

26. Биспецифически связывающийся белок по п. 21, в котором вариантная область Fc содержит по меньшей мере одну замену, выбранную из 221K, 221Y, 225E, 225K, 225W, 228P, 234D, 234E, 234N, 234Q, 234T, 234H, 234Y, 234I, 234V, 234F, 235A, 235D, 235R, 235W, 235P, 235S, 235N, 235Q, 235T, 235H, 235Y, 235I, 235V, 235E, 235F, 236E, 237L, 237M, 237P, 239D, 239E, 239N, 239Q, 239F, 239T, 239H, 239Y, 240I, 240A, 240T, 240M, 241W, 241L, 241Y, 241E, 241R, 243W, 243L, 243Y, 243R, 243Q, 244H, 245A, 247L, 247V, 247G, 250E, 250Q, 251F, 252L, 252Y, 254S, 254T, 255L, 256E, 256F, 256M, 257C, 257M, 257N, 262I, 262A, 262T, 262E, 263I, 263A, 263T, 263M, 264L, 264I, 264W, 264T, 264R, 264F, 264M, 264Y, 264E, 265A, 265G, 265N, 265Q, 265Y, 265F, 265V, 265I, 265L, 265H, 265T, 266I, 266A, 266T, 266M, 267Q, 267L, 268E, 269H, 269Y, 269F, 269R, 270E, 280A, 284M, 292P, 292L, 296E, 296Q, 296D, 296N, 296S, 296T, 296L, 296I, 296H, 296G, 297S, 297D, 297E, 298A, 298H, 298I, 298T, 298F, 299I, 299L, 299A, 299S, 299V, 299H, 299F, 299E, 305I, 308F, 313F, 316D, 318A, 318S, 320A, 320S, 322A, 322S, 325Q, 325L, 325I, 325D, 325E, 325A, 325T, 325V, 325H, 326A, 326D, 326E, 326G, 326M, 326V, 327G, 327W, 327N, 327L, 328S, 328M, 328D, 328E, 328N, 328Q, 328F, 328I, 328V, 328T, 328H, 328A, 329F, 329H, 329Q, 330K, 330G, 330T, 330C, 330L, 330Y, 330V, 330I, 330F, 330R, 330H, 331G, 331A, 331L, 331M, 331F, 331W, 331K, 331Q, 331E, 331S, 331V, 331I, 331C, 331Y, 331H, 331R, 331N, 331D, 331T, 332D, 332S, 332W, 332F, 332E, 332N, 332Q, 332T, 332H, 332Y, 332A, 333A, 333D, 333G, 333Q, 333S, 333V, 334A, 334E, 334H, 334L, 334M, 334Q, 334V, 334Y, 339T, 370E, 370N, 378D, 392T, 396L, 416G, 419H, 421K, 428L, 428F, 433K, 433L, 434A, 434W, 434Y, 436H, 440Y и 443W при нумерации согласно индексу ЕС по Кабату.

27. Биспецифически связывающийся белок по п. 21, в котором вариантная область Fc содержит одну или более аминокислотных замен в положениях, выбранных из 428 и 434 при нумерации согласно индексу ЕС по Кабату.
28. Биспецифически связывающийся белок по любому из пп. 21–27, в котором вариантная область Fc содержит одну или более аминокислотных замен, выбранных из 428L, 428F, 434A, 434W и 434Y.
29. Биспецифически связывающийся белок по любому из пп. 21–28, в котором вариантная область Fc содержит мутацию YTE.
30. Биспецифически связывающийся белок по любому из пп. 21–29, в котором вариантная область Fc имеет повышенную аффинность связывания с FcRn.
31. Биспецифически связывающийся белок по любому из пп. 21–30, в котором вариантная область Fc содержит тройную мутацию (TM) L234F/L235E/P331S.
32. Биспецифически связывающийся белок по любому из пп. 12–31, содержащий область Fc, причем область Fc является агликозилированной.
33. Биспецифически связывающийся белок по любому из пп. 12–31, содержащий область Fc, причем область Fc является дегликозилированной.
34. Биспецифически связывающийся белок по любому из пп. 12–31, содержащий область Fc, причем область Fc имеет пониженное фукозилирование или является афукозилированной.
35. Фармацевтическая композиция, содержащая биспецифически связывающийся белок по любому из пп. 1–34 и фармацевтически приемлемый носитель.

36. Фармацевтическая композиция по п. 35, дополнительно содержащая противоопухолевое соединение, выбранное из пеметрекседа, карбоплатина, гемцитабина, цисплатина, паклитаксела или их комбинаций.
37. Нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую биспецифически связывающийся белок по любому из пп. 1–34.
38. Нуклеиновая кислота по п. 37, в которой последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную последовательности SEQ ID NO:21, последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную последовательности SEQ ID NO:23, последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную последовательности SEQ ID NO:25, и/или последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную последовательности SEQ ID NO:27.
39. Нуклеиновая кислота по п. 37, в которой последовательность нуклеиновой кислоты содержит SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25 и/или SEQ ID NO:27.
40. Нуклеиновая кислота по п. 37, в которой последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную последовательности SEQ ID NO:22, последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную последовательности SEQ ID NO:24, последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную последовательности SEQ ID NO:26, и/или последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную последовательности SEQ ID NO:28.
41. Нуклеиновая кислота по п. 37, в которой последовательность нуклеиновой кислоты содержит SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:26 и/или SEQ ID NO:28.
42. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по любому из пп. 37–41.

43. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п. 42.
44. Клетка-хозяин, содержащая вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, на по меньшей мере 95% идентичную последовательности SEQ ID NO:21, последовательность нуклеиновой кислоты, на по меньшей мере 95% идентичную последовательности SEQ ID NO:23, последовательность нуклеиновой кислоты, на по меньшей мере 95% идентичную последовательности SEQ ID NO:25, и последовательность нуклеиновой кислоты, на по меньшей мере 95% идентичную последовательности SEQ ID NO:27.
45. Клетка-хозяин по п. 44, содержащая вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, на по меньшей мере 95% идентичную последовательности SEQ ID NO:22, последовательность нуклеиновой кислоты, на по меньшей мере 95% идентичную последовательности SEQ ID NO:24, последовательность нуклеиновой кислоты, на по меньшей мере 95% идентичную последовательности SEQ ID NO:26, и последовательность нуклеиновой кислоты, на по меньшей мере 95% идентичную последовательности SEQ ID NO:28.
46. Биспецифическое антитело, экспрессируемое клеткой-хозяином по любому из пп. 43–45.
47. Способ лечения имеющего опухоль субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества биспецифически связывающегося белка по любому из пп. 1–34, фармацевтической композиции по п. 35 или 36 или нуклеиновой кислоты по любому из пп. 37–41.
48. Способ лечения или профилактики рака у субъекта, включающий введение субъекту биспецифически связывающегося белка по любому из пп. 1–34, фармацевтической композиции по п. 35 или 36 или нуклеиновой кислоты по любому из пп. 37–41.

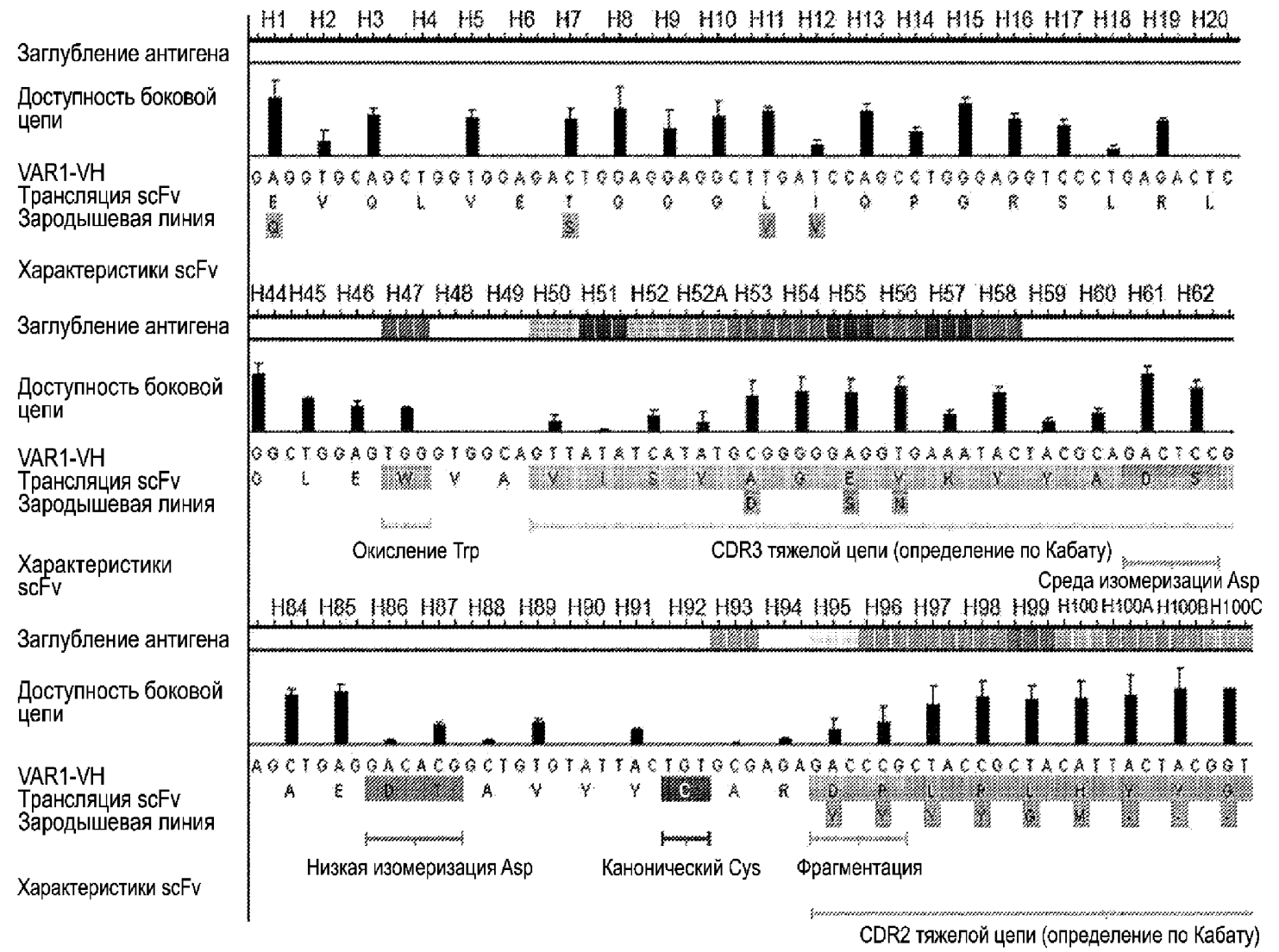
49. Способ по п. 48, в котором рак представляет собой один или более из рака яичника, рака молочной железы, рака толстой и прямой кишки, рака предстательной железы, рака шейки матки, рака матки, рака яичек, рака мочевого пузыря, рака головы и шеи, меланомы, рака поджелудочной железы, почечноклеточной карциномы и рака легких.
50. Способ по п. 48 или п. 49, причем рак представляет собой немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ).
51. Способ по п. 50, причем НМРЛ является распространенным или метастатическим.
52. Способ улучшения иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту биспецифически связывающегося белка по любому из пп. 1–34, фармацевтической композиции по п. 35 или 36 или нуклеиновой кислоты по любому из пп. 37–41.
53. Биспецифически связывающийся белок по любому из пп. 1–34 для применения в терапии.
54. Биспецифически связывающийся белок по любому из пп. 1–34 для применения в лечении рака.
55. Применение биспецифически связывающегося белка по любому из пп. 1–34 в производстве лекарственного препарата для лечения рака.
56. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 37–41 для применения в терапии.
57. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 37–41 для применения в лечении рака.

58. Применение нуклеиновой кислоты по любому из пп. 37–41 в производстве лекарственного препарата для лечения рака.

59. Способ лечения имеющего опухоль субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества биспецифически связывающегося белка по любому из пп. 1–34, фармацевтической композиции по п. 35 или 36 или нуклеиновой кислоты по любому из пп. 37–41 в комбинации с противоопухолевым соединением, выбранным из пеметрекседа, карбоплатина, гемцитабина, цисплатина, паклитаксела или их комбинаций.

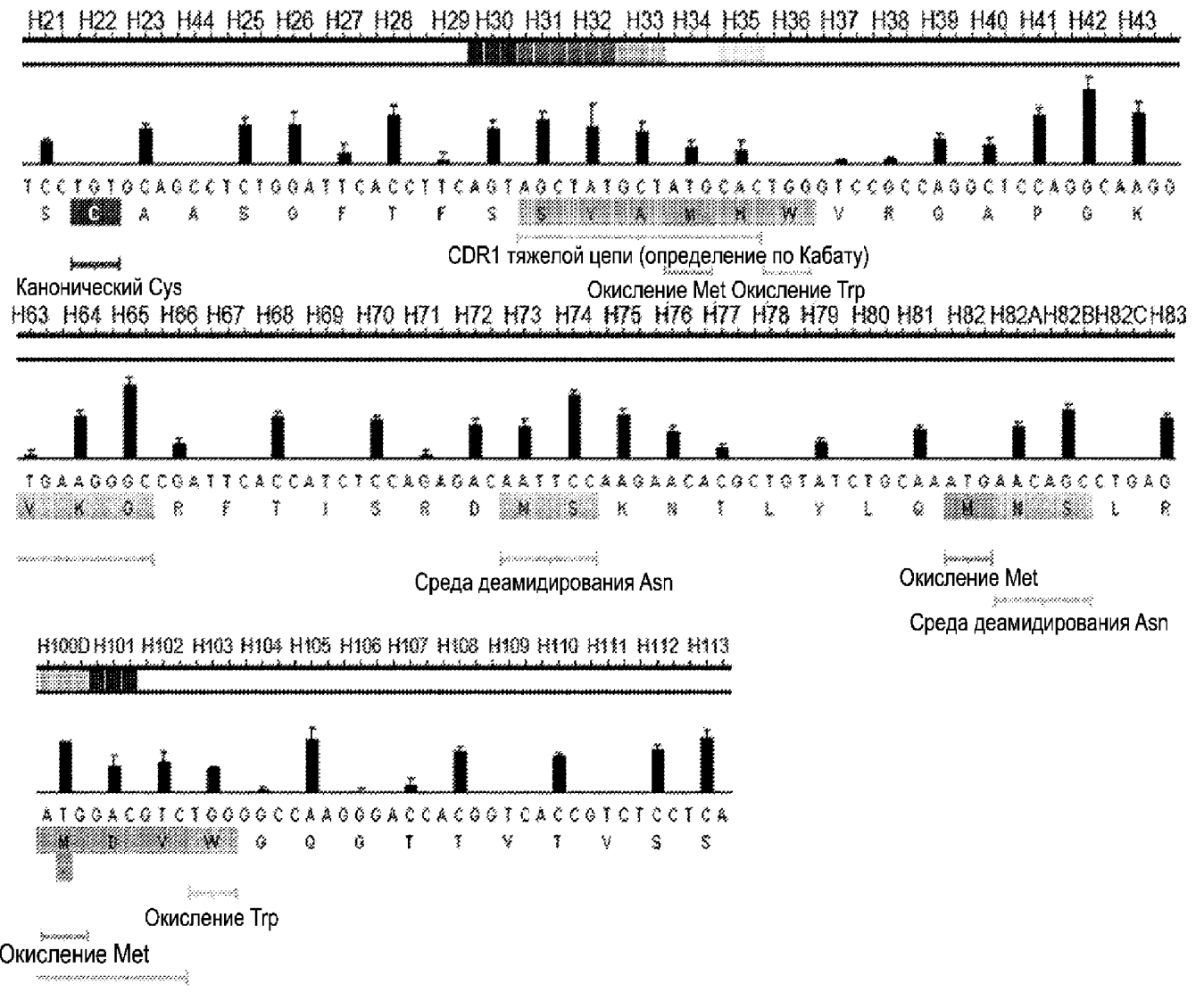
60. Способ лечения или профилактики рака у субъекта, включающий введение биспецифически связывающегося белка по любому из пп. 1–34, фармацевтической композиции по п. 35 или 36 или нуклеиновой кислоты по любому из пп. 37–41 в комбинации с противоопухолевым соединением, выбранным из пеметрекседа, карбоплатина, гемцитабина, цисплатина, паклитаксела или их комбинаций.

ЗАМЕНЕННЫЙ ЛИСТ (ПРАВИЛО 26)

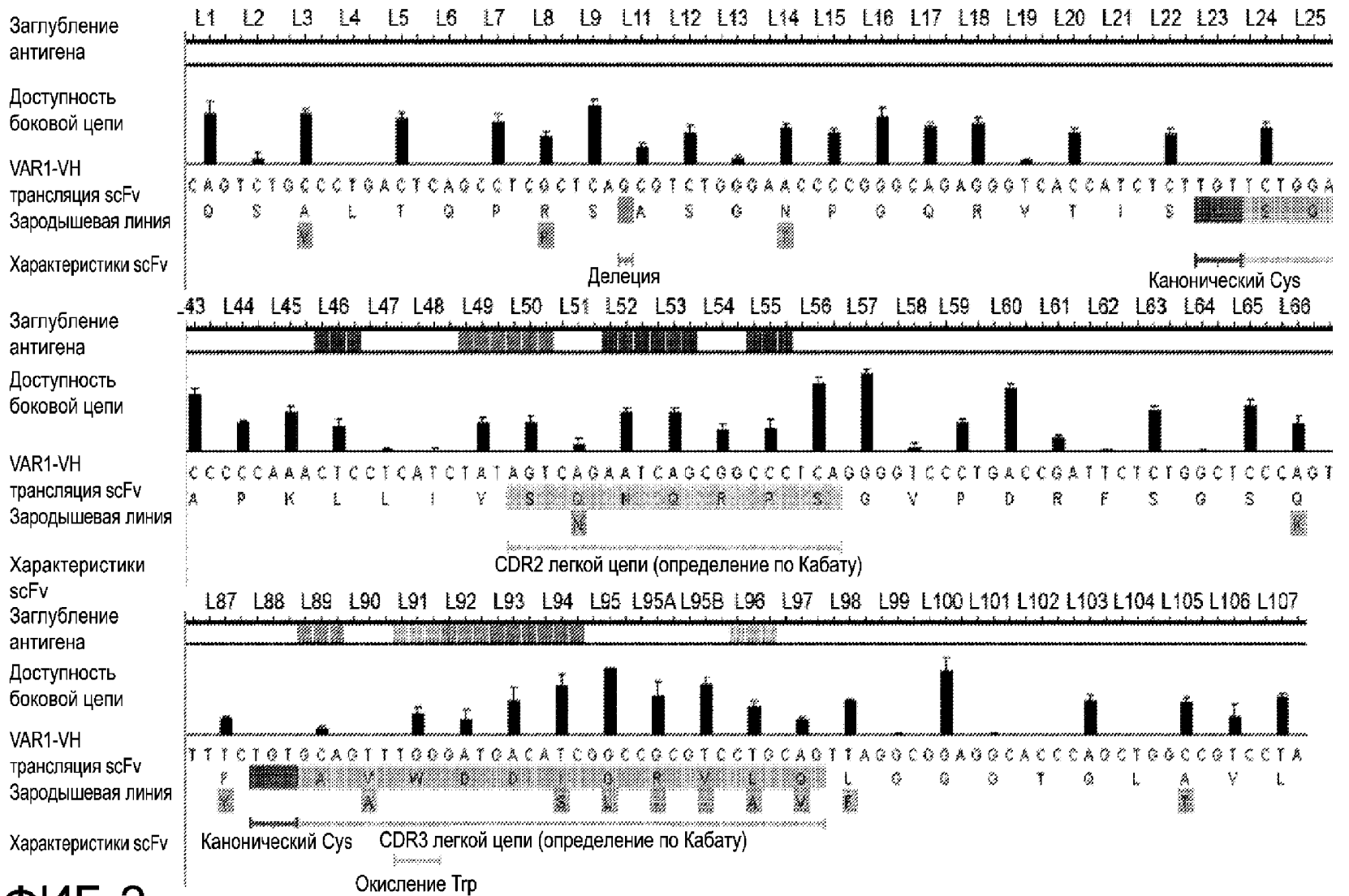


ФИГ. 1

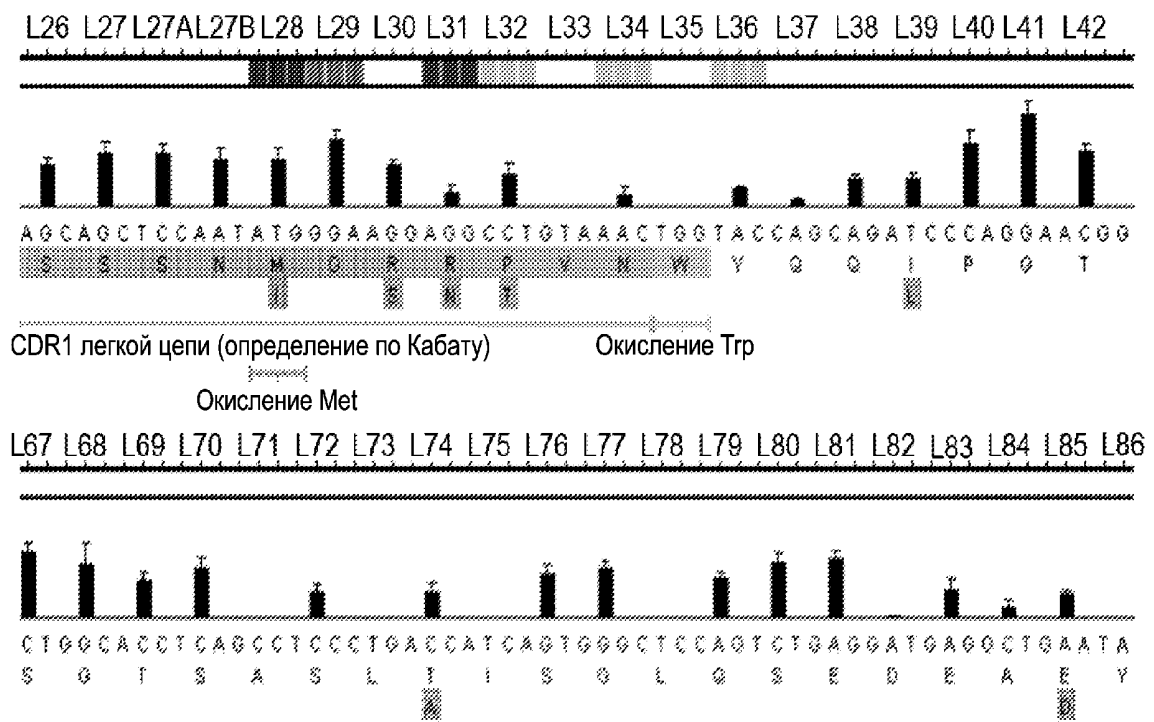
ЗАМЕННЫЙ ЛИСТ (ПРАВИЛО 26)



ФИГ. 1
(продолж.)



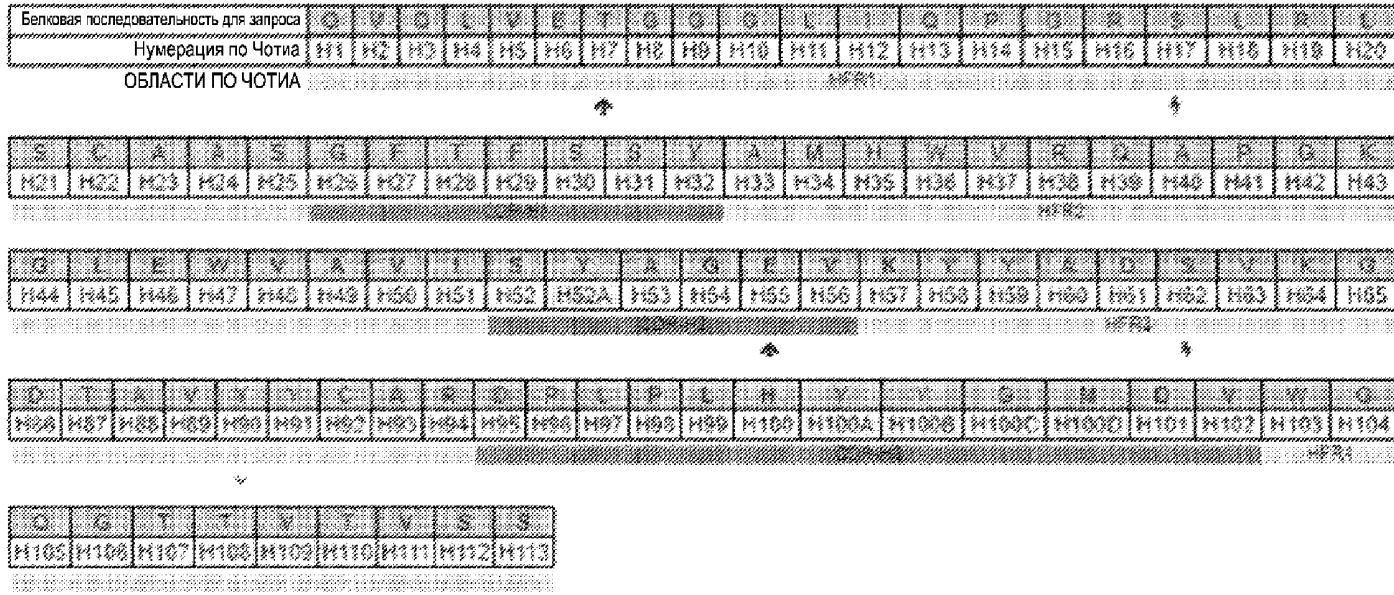
ФИГ. 2



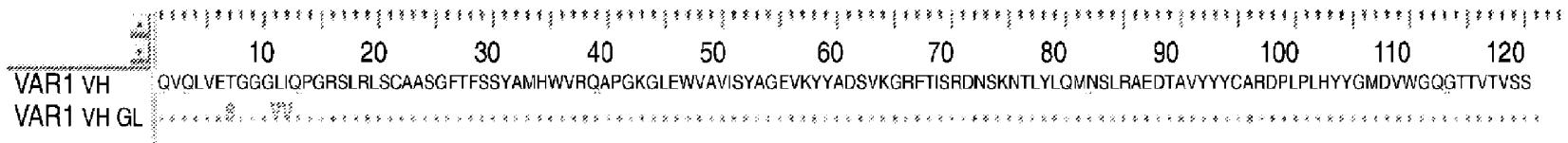
ФИГ. 2
(продолж.)

Нумерация и области

Показаны остатки 1–121 из 121 остатка:



- ⚡ Прогнозируемый сайт фосфорилирования PKC
- < Прогнозируемый сайт фосфорилирования TYR KIN
- ▭ Вставка
- ⬆ Необычный остаток (< 1% от последовательностей)



ФИГ. 3А

ЗАМЕНЕННЫЙ ЛИСТ (ПРАВИЛО 26)

ЗАМЕННЫЙ ЛИСТ (ПРАВИЛО 26)

				<-----FR1-IMGT-----><-----CDR1-IM	
				V Q L V E T G G G L I Q P G R S L R L S C A A S G F T F S	
		Запрос_1	1	CAAGTGCAGCTGDTGAGACTGGAGGAGGCTTGTATCCAGCCTGGGAGGTCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGATTCACTTCAAT	90
V	95,6% (283/296)	IGHV3-30*04	1T...G...G..G.....	90
				Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C A A S G F T F S	
V	95,6% (283/296)	IGHV3-30-2*01	1T...G...G..G.....	90
V	95,6% (283/296)	IGHV3-30-2*02	1Y...G...G..G.....	90
		KY1988912	1Y...G...G..G.....	90
		KY1988922	1Y...G...G..G.....	90
		KY1988934	1Y...G...G..G.....	90
		KY1988943	1T...G...G..G.....	90
		KJ134255	1Y...G...G..G.....	90
				GT-----><-----FR2-IMGT-----><-----CDR2-IMGT-----><-----	
				S Y A M H W V R Q A P G K G L E W V A V I S Y A G E V K Y Y	
		Запрос_1	91	AGCTATGCTATGCACTGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGCCGGGGAGGTGAAATACTAC	180
V	95,6% (283/296)	IGHV3-30*04	91AT..AAGTAAAT.....	180
				S Y A M H W V R Q A P G K G L E W V A V I S Y G G S N K Y Y	
V	95,6% (283/296)	IGHV3-30-2*01	91AT..AAGCAAT.....	180
V	95,6% (283/296)	IGHV3-30-2*02	91AT..AAGTAAAT.....	180
		KY1988912	91AT..AAGCAAT.....	180
		KY1988922	91AT..AAGTAAAT.....	180
		KY1988934	91AT..AAGCAAT.....	180
		KY1988943	91AT..AAGTAAAT.....	180
		KJ134255	91AT..AAGCAAT.....	180

ФИГ. 3В

ЗАМЕННЫЙ ЛИСТ (ПРАВИЛО 26)

			-----FR3-IMGT-----	
			A D S V K G R F T I S R D N S K M T L Y L Q M N S L R A E D	
	Запрос_1	181	GCAGACTCCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGAC	270
V	95,6% (283/296)	<u>IGMV3-30*04</u>	181	270
			A D S V K G R F T I S R D N S K M T L Y L Q M N S L R A E D	
V	95,6% (283/296)	<u>IGMV3-30-3*01</u>	181	270
V	95,6% (283/296)	<u>IGMV3-30-3*03</u>	181	270
	95,6% (283/296)	<u>KY198812</u>	181	270
	95,6% (283/296)	<u>KY198822</u>	181	270
	95,6% (283/296)	<u>KY198834</u>	181	270
	95,6% (283/296)	<u>KY198943</u>	181	270
	95,6% (283/296)	<u>KJ134255</u>	181	270
			-----><-----COR3-IMGT----->	
			T A V Y Y C A R D P L P L H Y Y G M D V W G Q G T T V T V S	
	Запрос_1	271	ACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGACCCGCTACCGCTACATTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAAGGGACCACGGTCACCGTCTCC	360
V	95,6% (283/296)	<u>IGMV3-30*04</u>	271	296
			T A V Y Y C A R	
V	95,6% (283/296)	<u>IGMV3-30-5*01</u>	271	296
V	95,6% (283/296)	<u>IGMV3-30-3*03</u>	271	296
D	100,0% (6/6)	<u>IGHD5-24*01</u>	10	15
D	100,0% (5/5)	<u>IGHD1-26*01</u>	13	17
D	100,0% (5/5)	<u>IGHD1-26*01</u>	13	17
J	100,0% (51/51)	<u>IGHJ6*02</u>	12	59
J	98,0% (50/51)	<u>IGHJ6*01</u>	12	59
J	98,0% (50/51)	<u>IGHJ6*04</u>	12	59
	95,6% (283/296)	<u>KY198812</u>	271	296
	95,6% (283/296)	<u>KY198822</u>	271	296
	95,6% (283/296)	<u>KY198834</u>	271	296
	95,6% (283/296)	<u>KY198943</u>	271	296
	95,6% (283/296)	<u>KJ134255</u>	271	296

ФИГ. 3В (продолж.)

ЗАМЕННЫЙ ЛИСТ (ПРАВИЛО 26)

Нумерация и области

Показаны остатки 1–110 из 110 остатков:

Белковая последовательность для запроса	Q	S	A	L	V	D	P	R	S	A	S	D	N	P	G	D	R	V	T	L
Нумерация по Чотиа	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	L20	L21

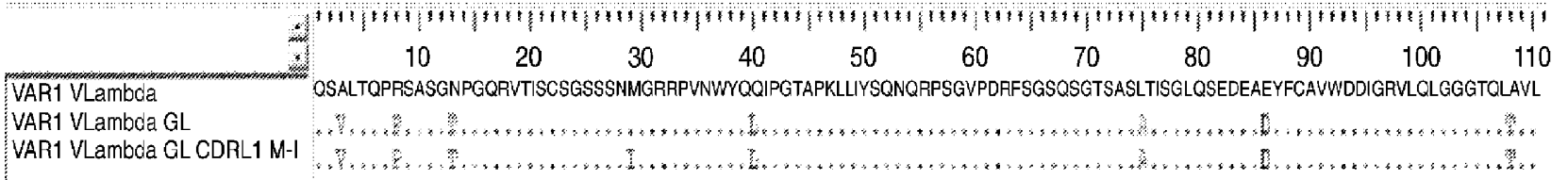
ОБЛАСТИ ПО ЧОТИА

S	S	S	S	S	S	S	N	M	D	R	E	P	V	N	N	Y	D	D	L	P	G	T
L22	L23	L24	L25	L26	L27	L28	L29	L30	L30A	L30B	L31	L32	L33	L34	L35	L36	L37	L38	L39	L40	L41	L42

G	S	G	T	S	A	S	L	T	L	S	G	L	G	S	E	D	E	A	E	Y	F	C
L66	L67	L68	L69	L70	L71	L72	L73	L74	L75	L76	L77	L78	L79	L80	L81	L82	L83	L84	L85	L86	L87	L88

A	V	W	D	D	I	G	R	V	L	D	L	G	G	G	T	G	L	A	Y	L
L89	L90	L91	L92	L93	L94	L95	L95A	L95B	L96	L97	L98	L99	L100	L101	L102	L103	L104	L105	L106	L106A

- Прогнозируемый сайт амидирования PKC
- Прогнозируемый сайт фосфорилирования SK2
- Вставка
- Необычный остаток (< 1% от последовательностей)



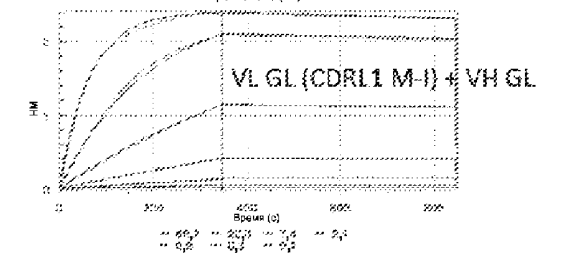
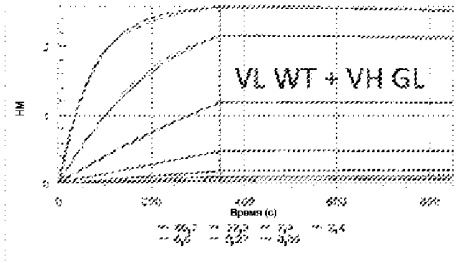
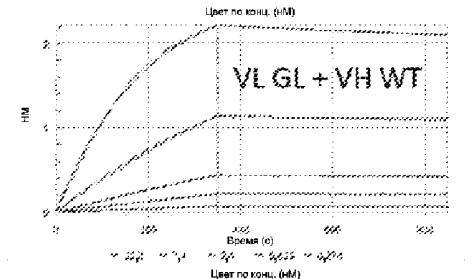
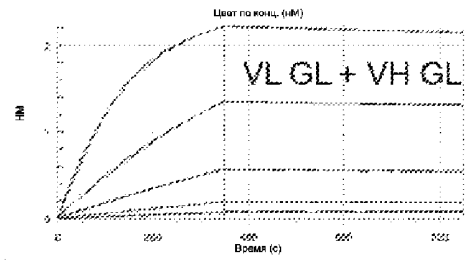
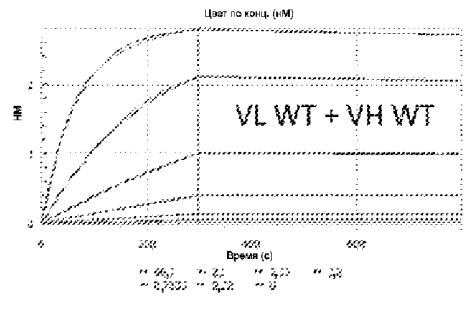
ФИГ. 4А

ЗАМЕННЫЙ ЛИСТ (ПРАВИЛО 26)

			-----FR3-IMGT----->	
		Запрос_1	181	D R F S G S Q S G T S A S L T I S G L Q S E D E A E Y F C A
V	92,9% (263/283)	<u>IGLV1-44*01</u>	181	GACCGATTCTCTGGCTCCCAGTCTGGCACCTCAGCCCTCCCTGACCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGAATATTTCTGTGCA 270
			A.....G.....T...A..... 270
				D R F S G S K S G T S A S L A I S G L Q S E D E A D Y Y C A
V	91,5% (259/283)	<u>IGLV1-47*02</u>	181A.....G.....G...C.....T...A..... 270
V	91,2% (258/283)	<u>IGLV1-47*01</u>	181A.....G.....G...C.....T...A..... 270
	93,6% (265/283)	<u>A1400472</u>	181A.....G.....T...A..... 270
	93,3% (263/282)	<u>A1578389</u>	180A.....G.....GT...A..... 269
	92,9% (263/283)	<u>AC253551</u>	33253A.....G.....T...A..... 33164
	92,9% (263/283)	<u>K1067746</u>	181A.....G.....T...A..... 270
	92,9% (263/283)	<u>KT304597</u>	181A.....G.....T...A..... 270
			-----CDR3-IMGT----->	
		Запрос_1	271	V W D D I G R V L Q L G G G T Q L A V L
V	92,9% (263/283)	<u>IGLV1-44*01</u>	271	GTTTGGGATGACATCGGCCCGTCTCTGCAATTAGCCGGAGGCACCCAGCTGGCCGTCCCTA 330
				.CA..... 283
				A W D D
V	91,5% (259/283)	<u>IGLV1-47*02</u>	271	.CA..... 283
V	91,2% (258/283)	<u>IGLV1-47*01</u>	271	.CA..... 283
J	90,0% (27/30)	<u>IGLJ7*01</u>	7C..A.....A..... 36
J	87,1% (27/31)	<u>IGLJ3*02</u>	7C.....G...A...A..... 37
J	86,7% (26/30)	<u>IGLJ2*02</u>	7C..A.....A...C... 36
	93,6% (265/283)	<u>A1400472</u>	271	.CA..... 283
	93,3% (263/282)	<u>A1578389</u>	270	.CA..... 282
	92,9% (263/283)	<u>AC253551</u>	33163	.CA..... 33151
	92,9% (263/283)	<u>K1067746</u>	271	.CA..... 283
	92,9% (263/283)	<u>KT304597</u>	271	.CA..... 283

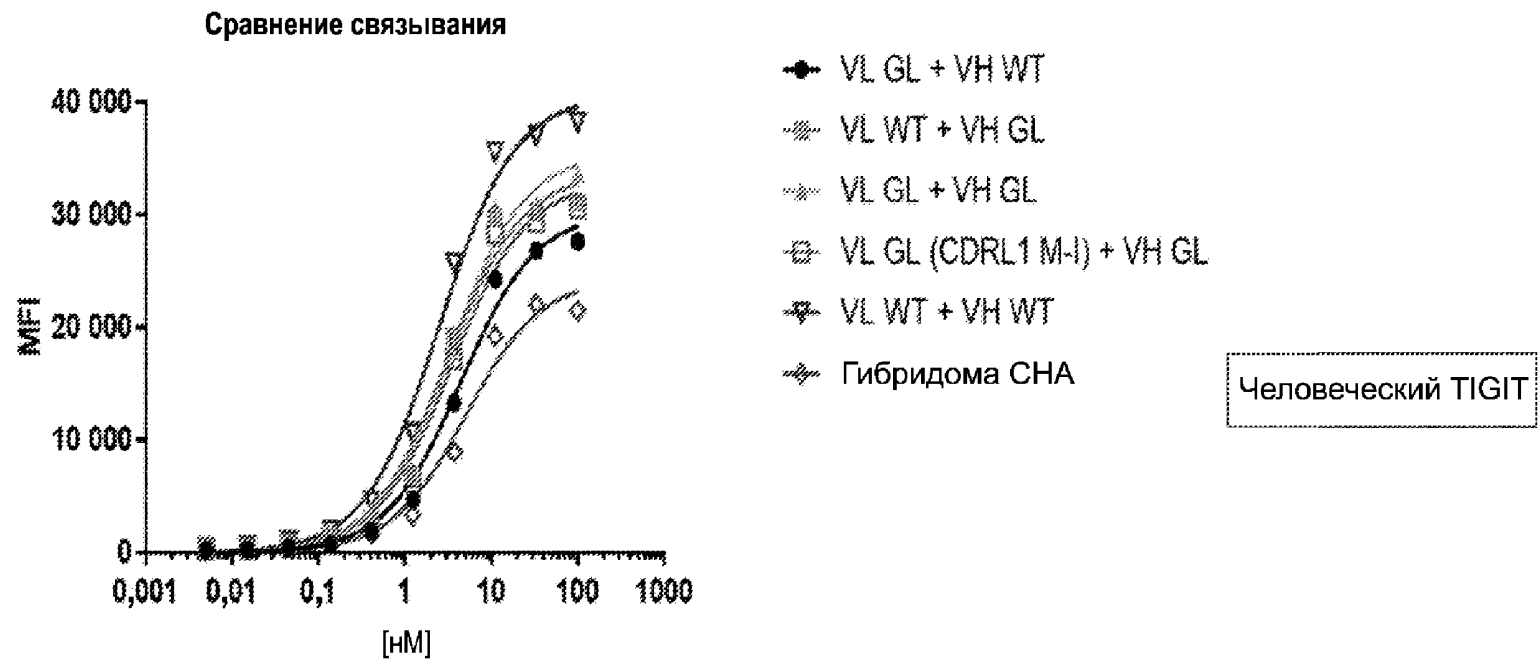
ФИГ. 4В (продолж.)

Идентификатор образца	KD (M)	Ошибка KD	kon (1/мс)	Ошибка kon	kdis (1/с)	Ошибка kdis	Полный X^2	Полный R^2
VL WT + VH WT	2,27E-10	1,28E-11	2,19E+05	9,67E+02	4,96E-05	2,78E-06	0,115366	0,999806
VL GL + VH WT	4,33E-10	1,82E-11	2,36E+05	1,79E+03	1,02E-04	3,75E-06	0,084777	0,999698
VL WT + VH GL	1,48E-10	1,37E-11	2,02E+05	1,02E+03	2,99E-05	3,16E-06	0,190995	0,99969
VL GL + VH GL	2,23E-10	9,01E-12	3,04E+05	1,46E+03	6,78E-05	2,72E-06	0,050076	0,999837
VL GL (CDRL1 M-I) + VH GL	2,87E-10	1,62E-11	2,31E+05	1,34E+03	6,62E-05	3,72E-06	0,230532	0,999599



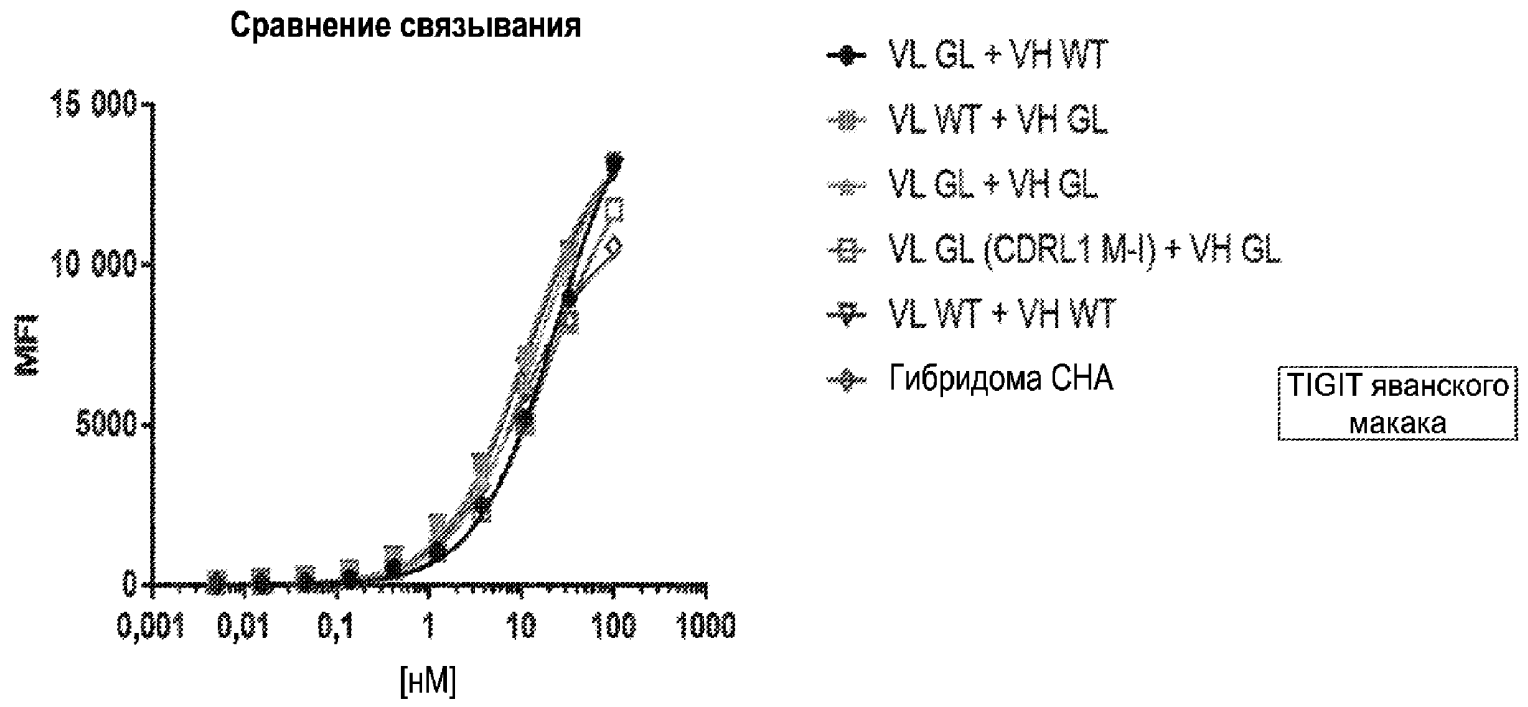
био-TIGIT 0,5 мкг/мл, захваченный на сенсоры SA с последующим связыванием DuetMas

ФИГ. 5



	VL GL + VH WT	VL WT + VH GL	VL GL + VH GL	VL GL (CDRL1 M-I) + VH GL	VL WT + VH WT	Гибридома CHA
Kd	4,427	3,092	3,281	3,423	2,556	5,051

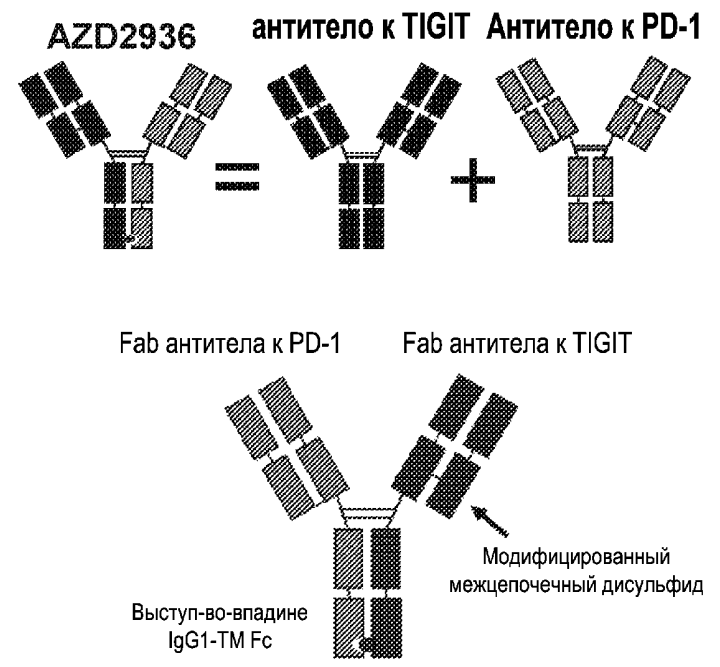
ФИГ. 6А



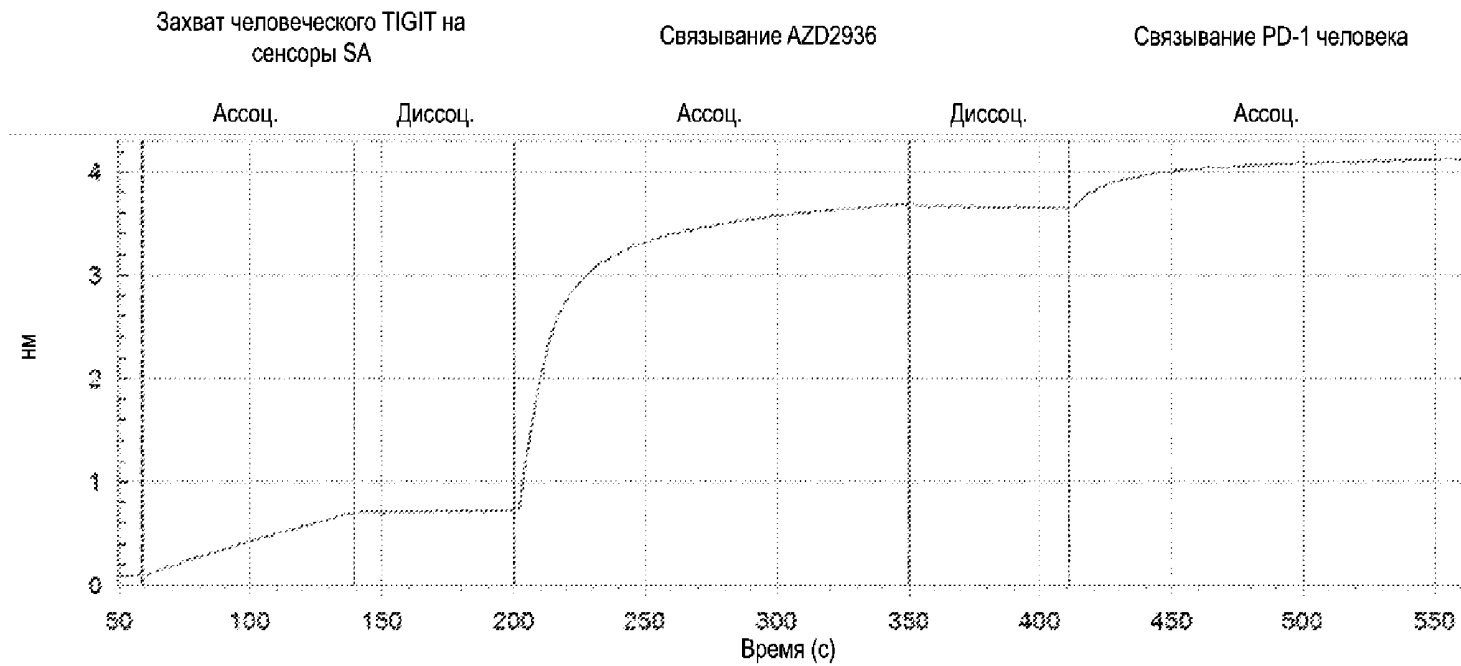
	VL GL + VH WT	VL WT + VH GL	VL GL + VH GL	VL GL (CDRL1 M-I) + VH GL	VL WT + VH WT	Гибридома CHA
Kd	23,56	10,70	14,69	13,9	11,23	0,899

ФИГ. 6В

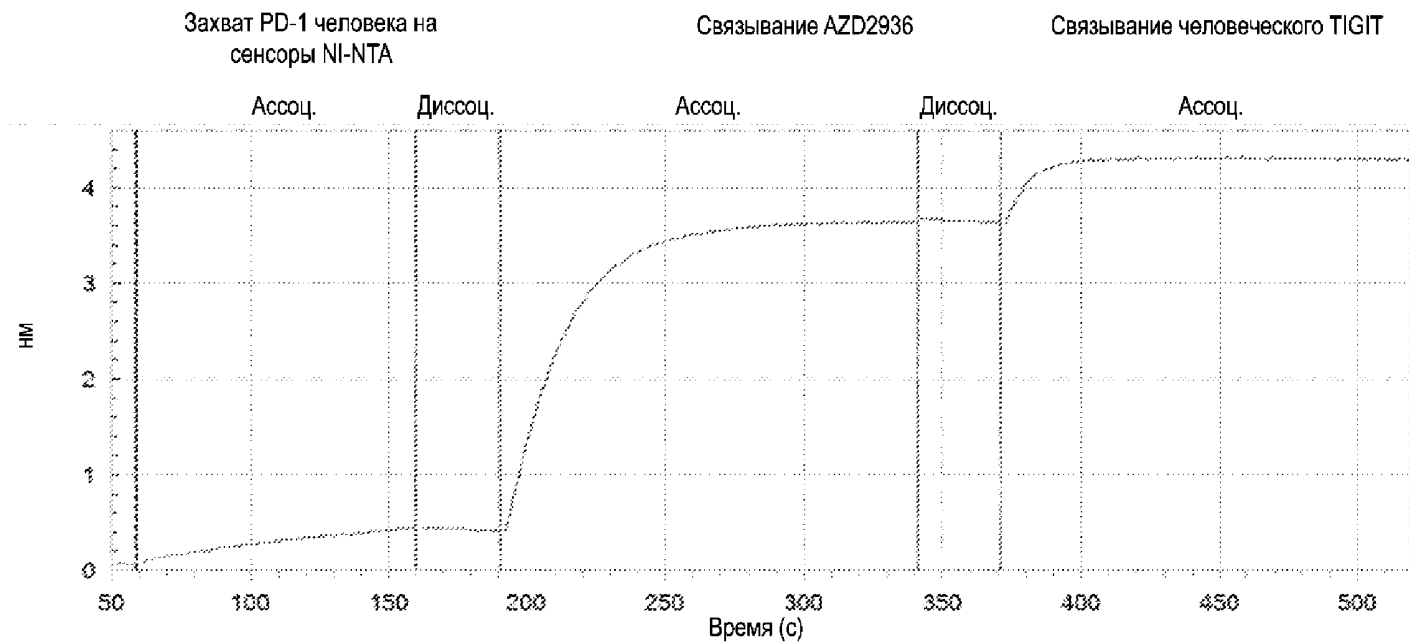
Категория	AZD2936	
Биспецифический формат: DuetMab		
Изотип Fc	IgG1-TM человека	
Плечо к PD-1	LO115 V гены вставлены на каппа LC и впадину HC	
Плечо к TIGIT	VAR1 V гены вставлены на лямбда LC и выступ HC	
K _D с PD-1	Человек	0,4 нМ
	Яванский макак	0,3 нМ
K _D с TIGIT	Человек	15 нМ
	Яванский макак	41 нМ



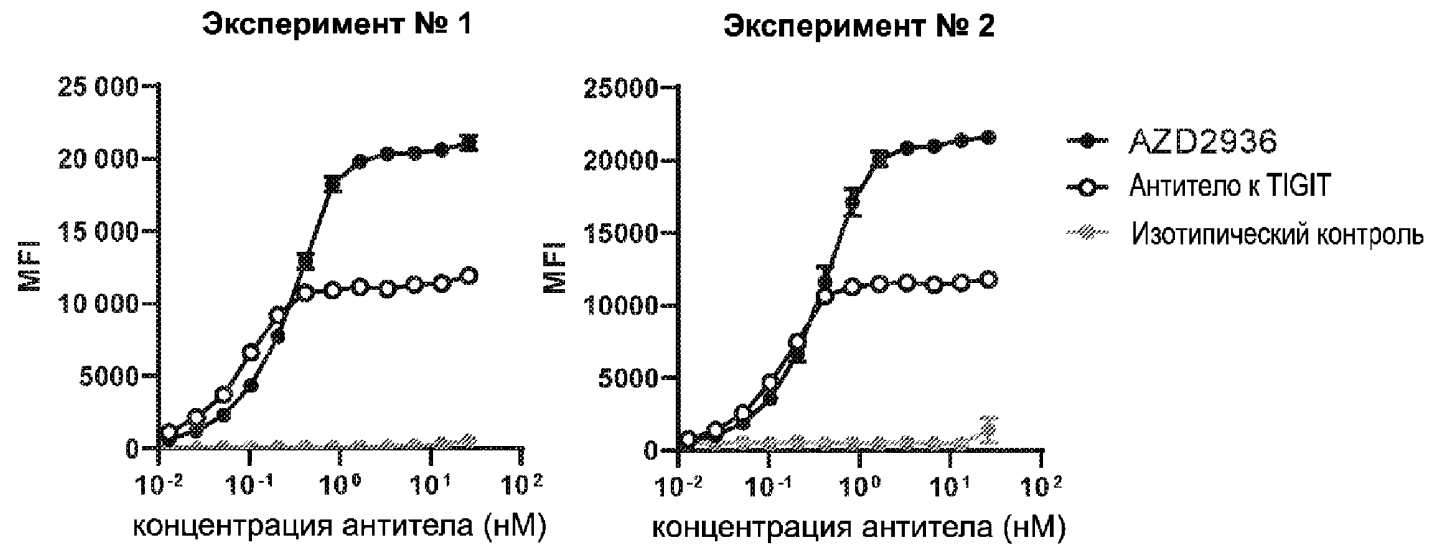
ФИГ. 7



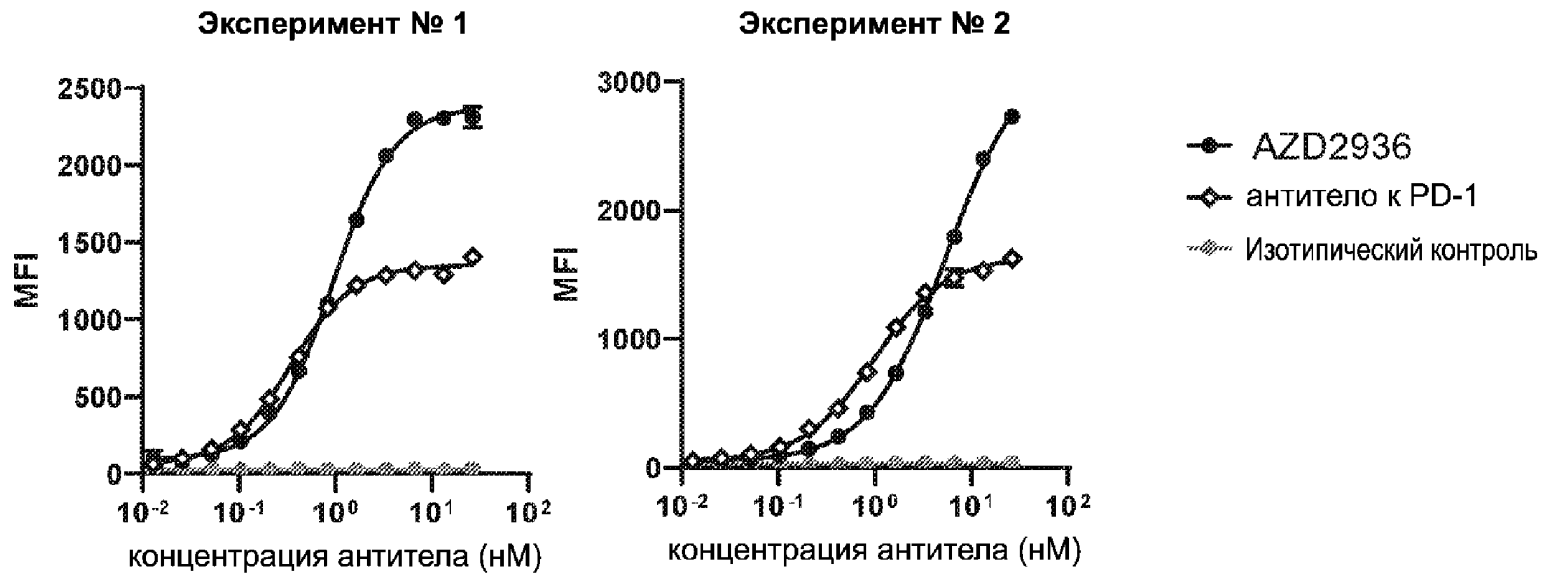
ФИГ. 8А



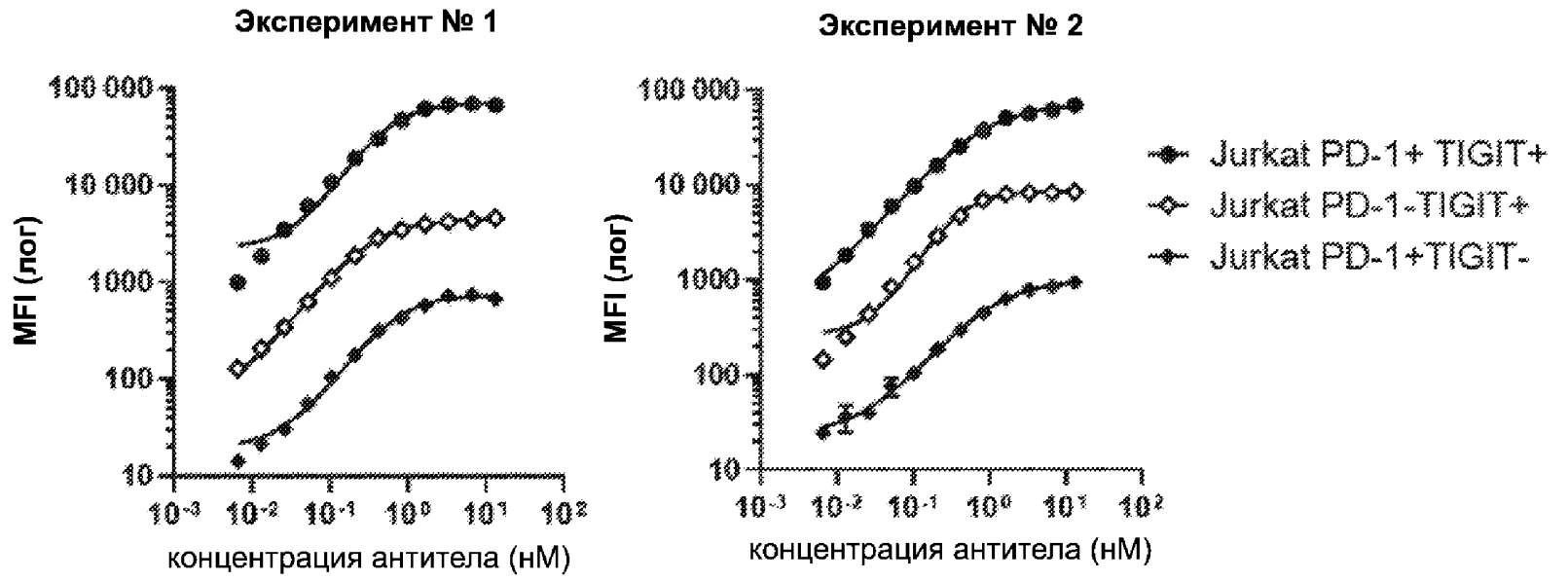
ФИГ. 8В



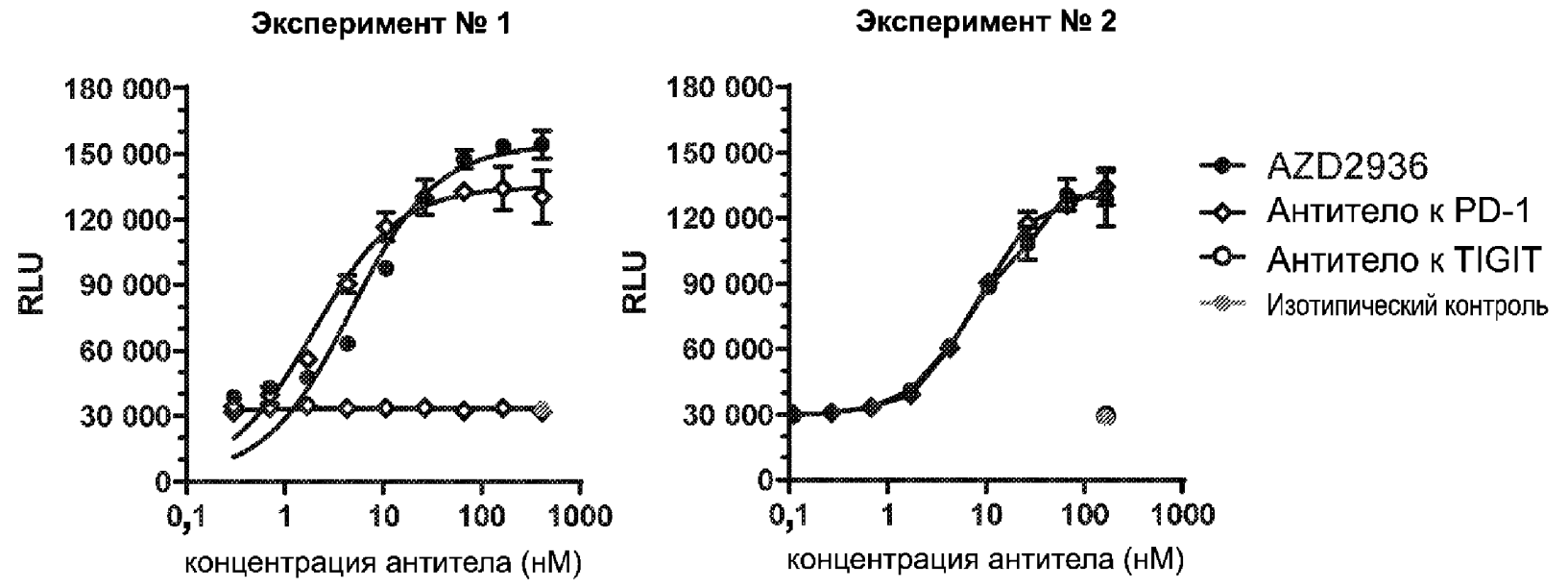
ФИГ. 9А



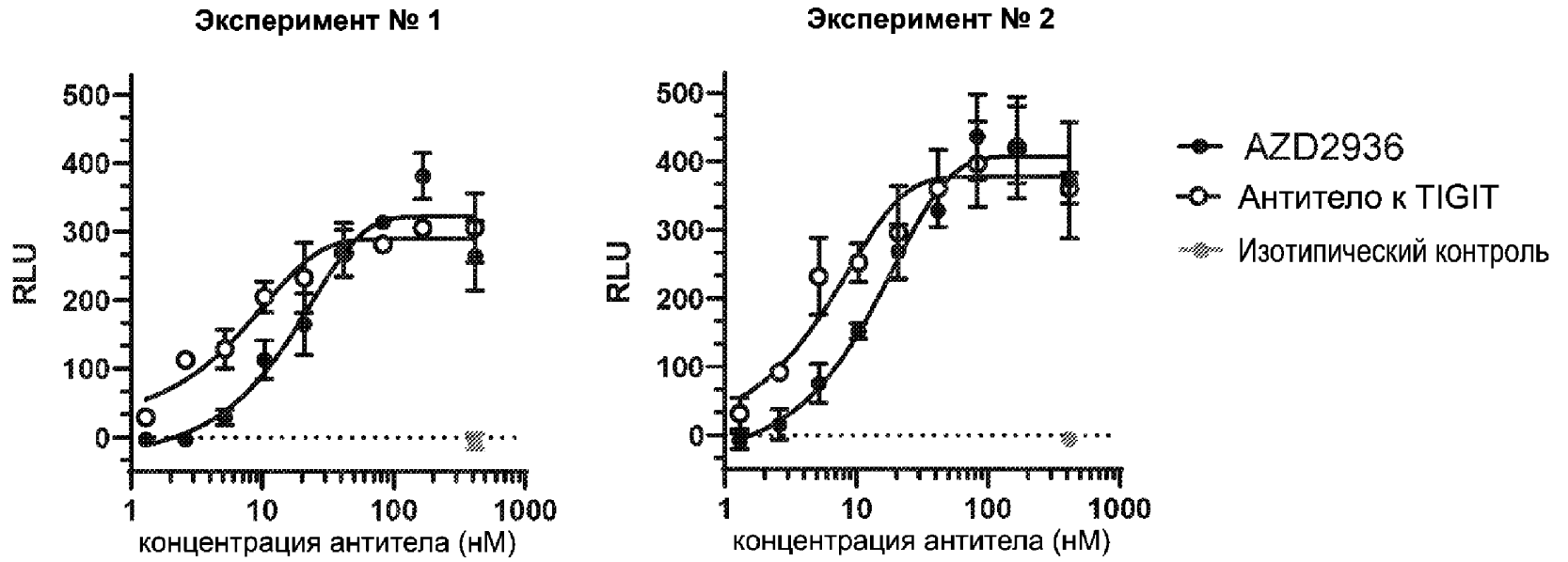
ФИГ. 9В



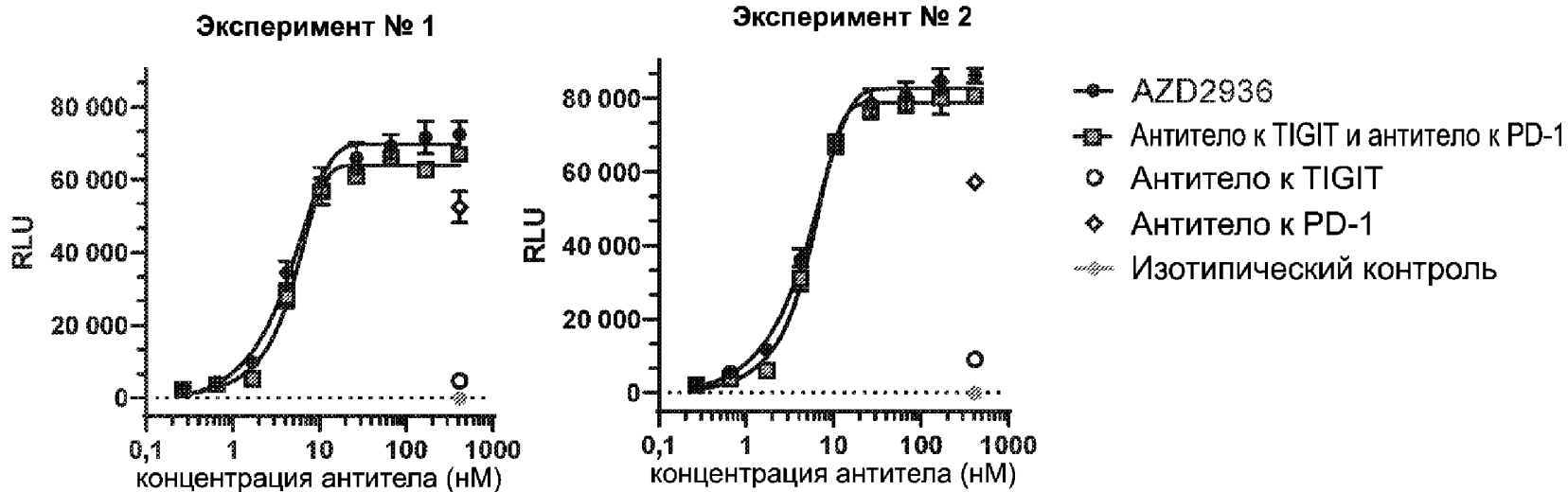
ФИГ. 9С



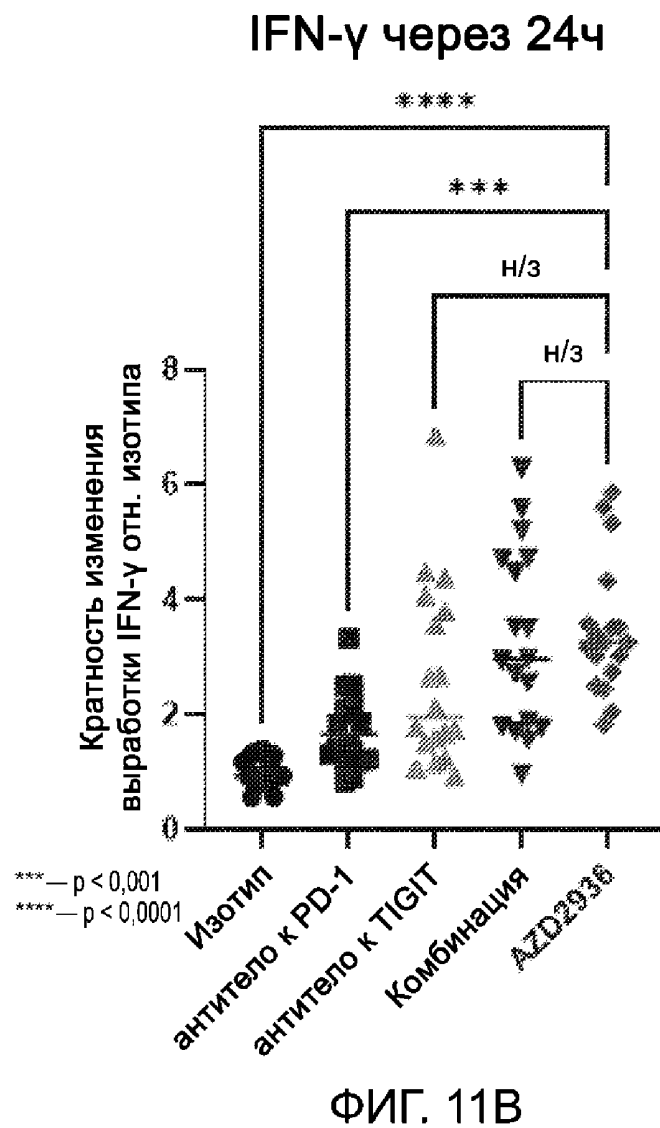
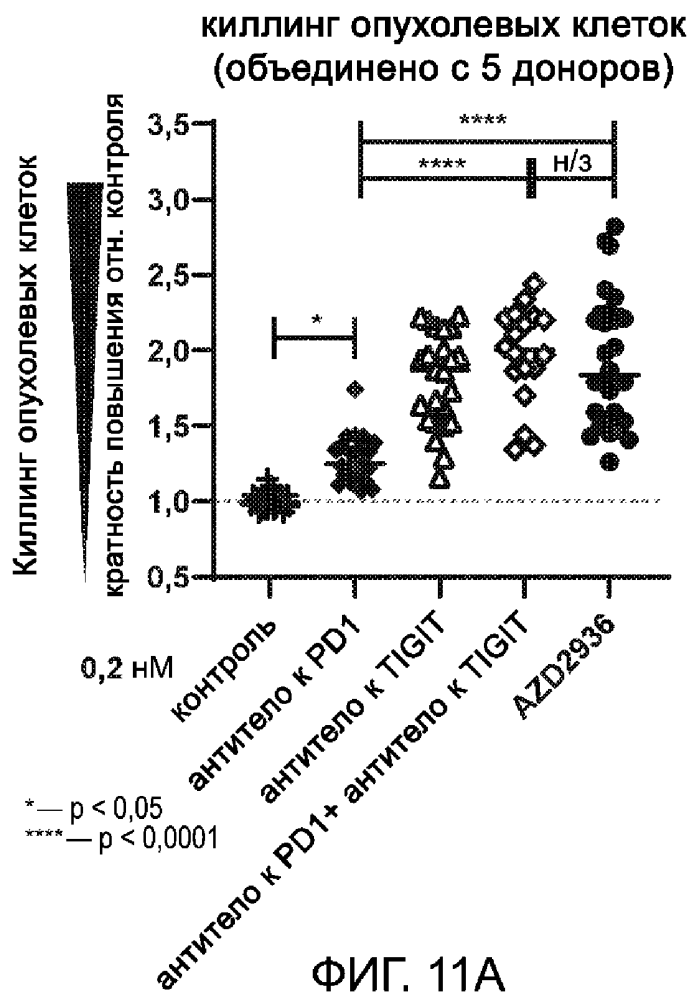
ФИГ. 10А



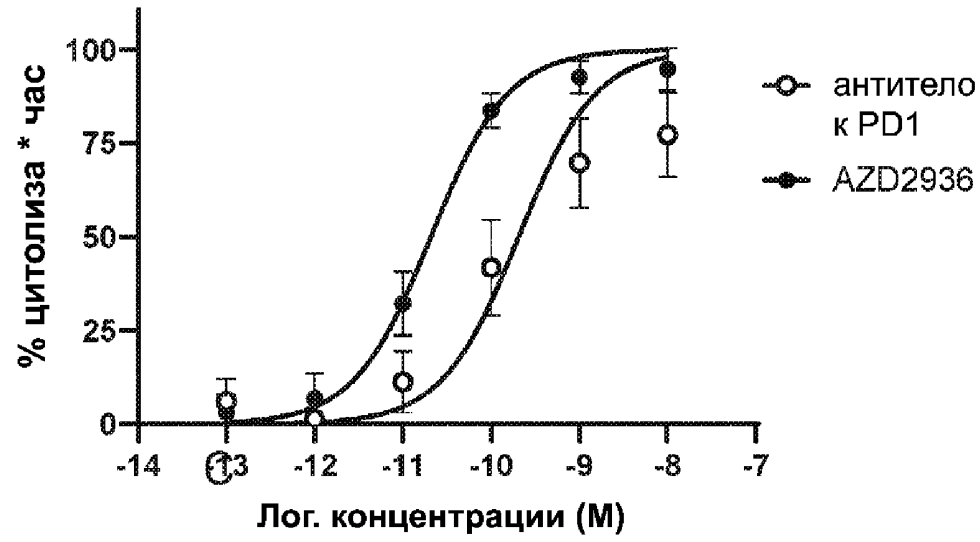
ФИГ. 10В



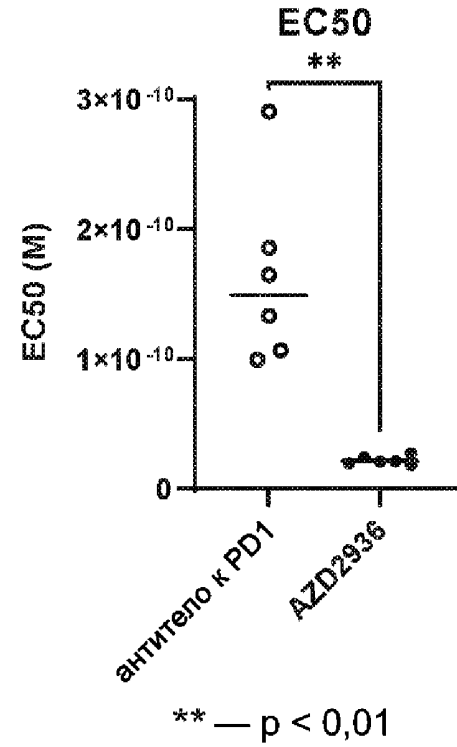
ФИГ. 10С



Цитотоксичность от дозы



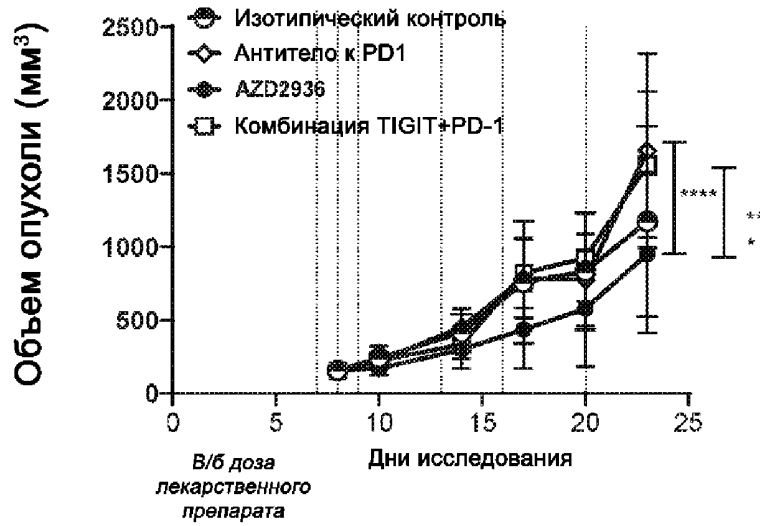
ФИГ. 11C



ФИГ. 11D

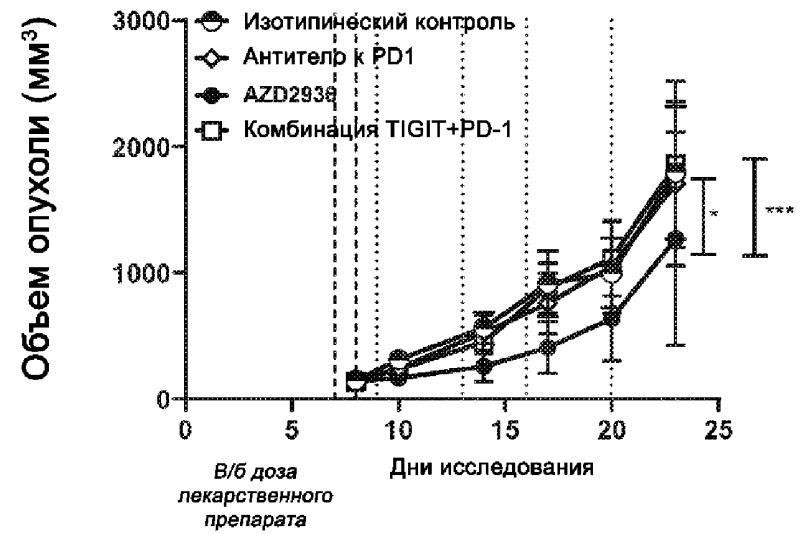
Ингибирование роста опухоли OE21

Донор 198165



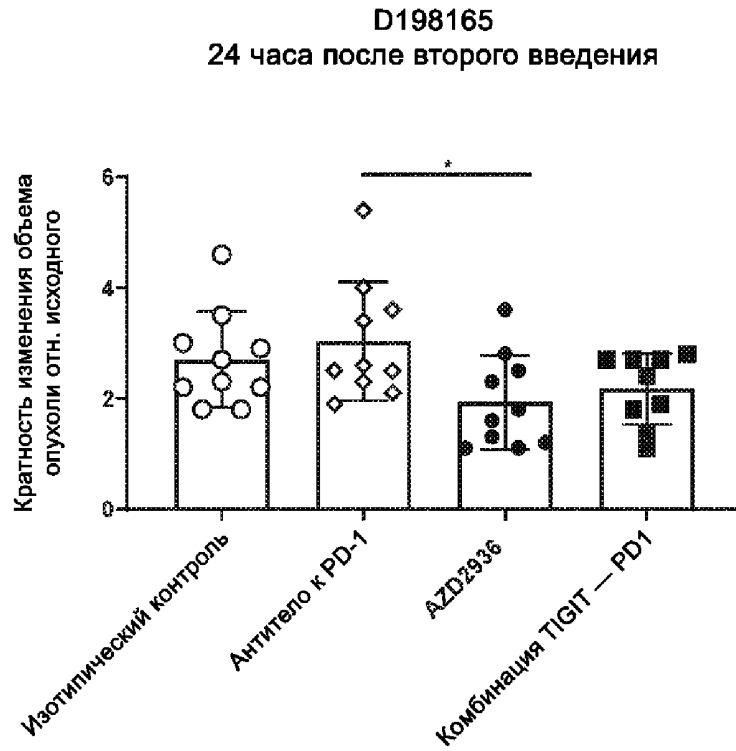
ФИГ. 12А

Донор 148026

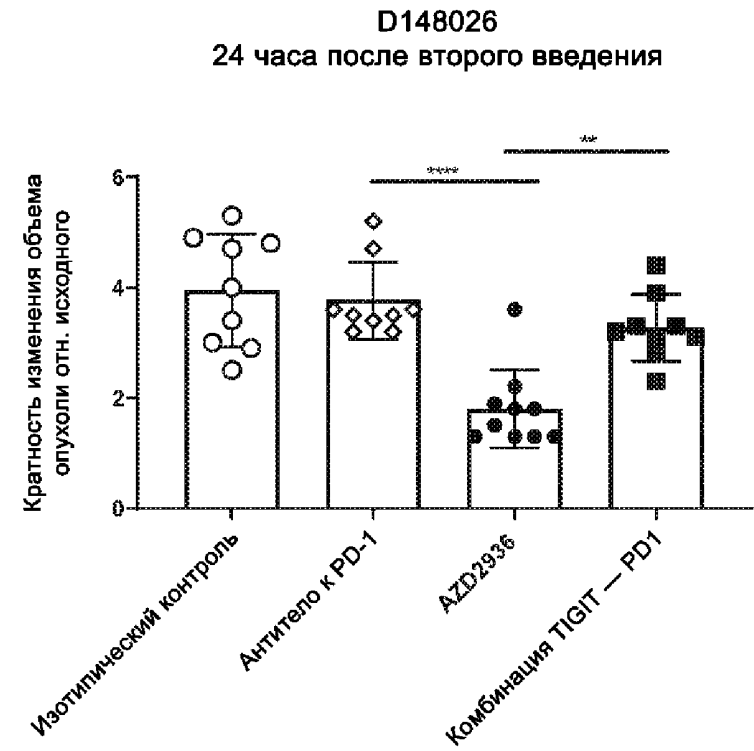


ФИГ. 12В

Ингибирование роста опухоли OE21

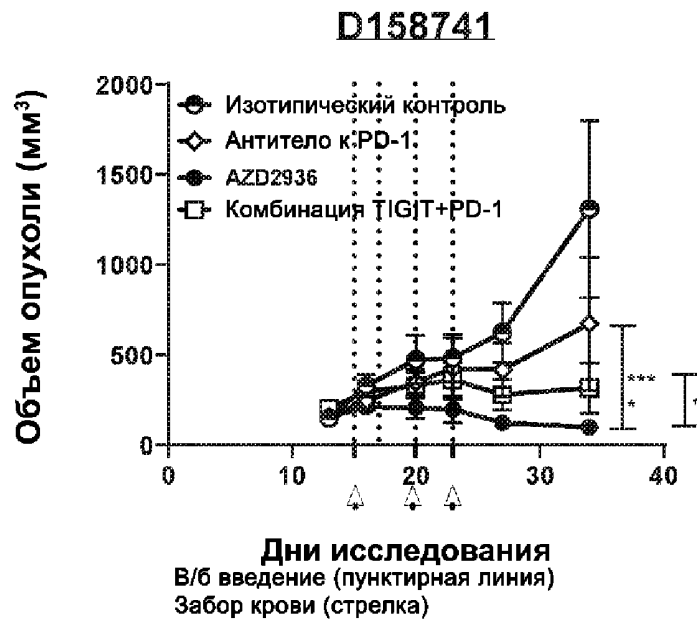


ФИГ. 12C

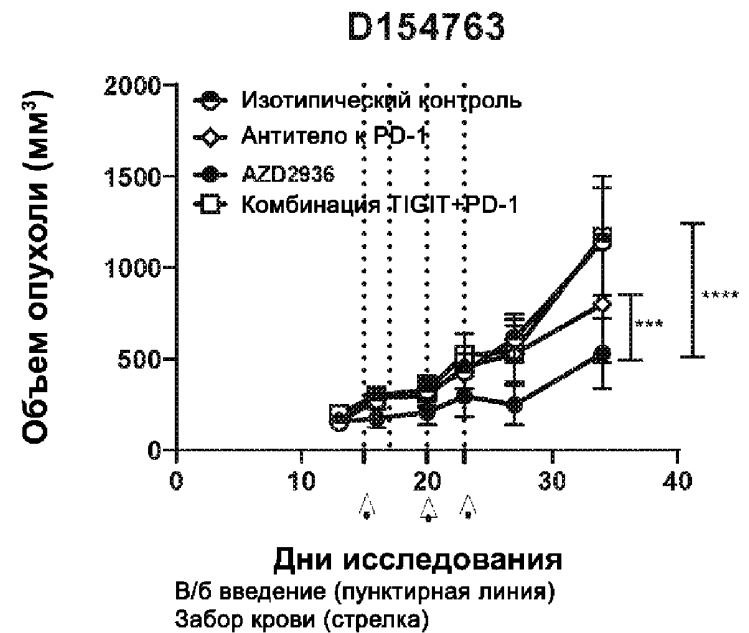


ФИГ. 12D

Ингибирование роста опухоли PC9-MART1

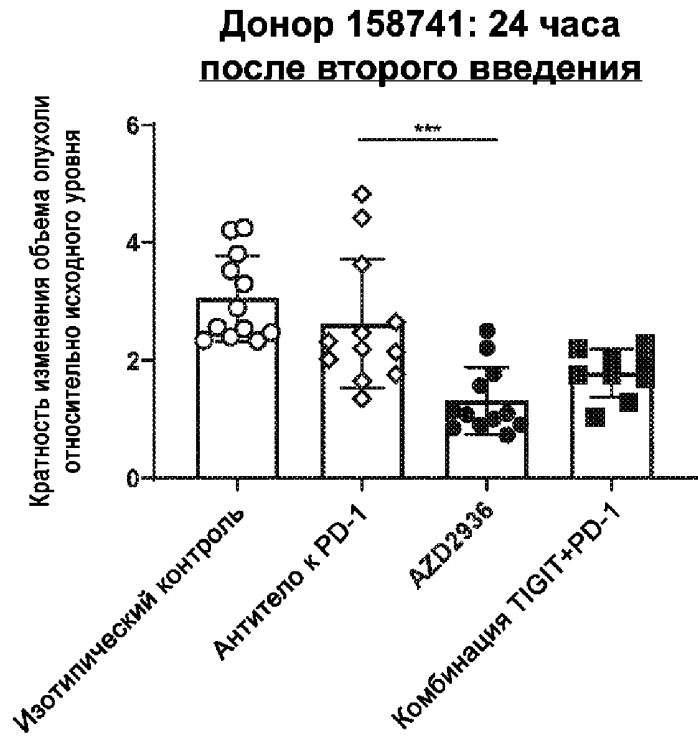


ФИГ. 13А

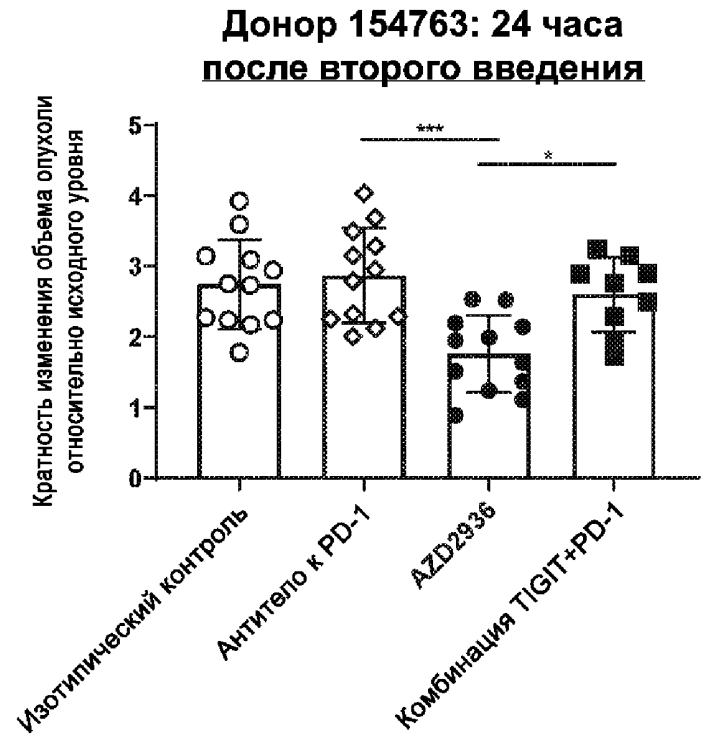


ФИГ. 13В

Ингибирование роста опухоли PC9-MART1

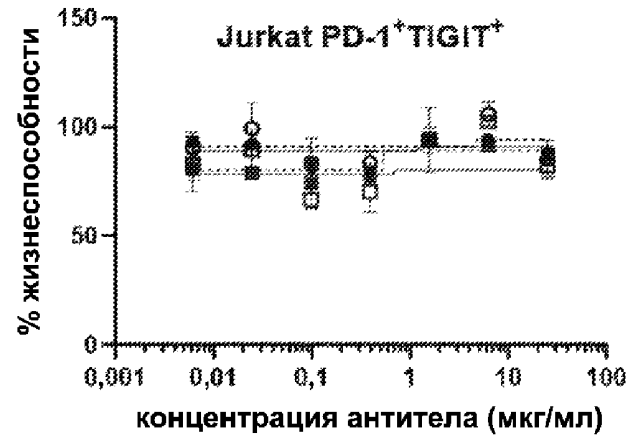


ФИГ. 13С



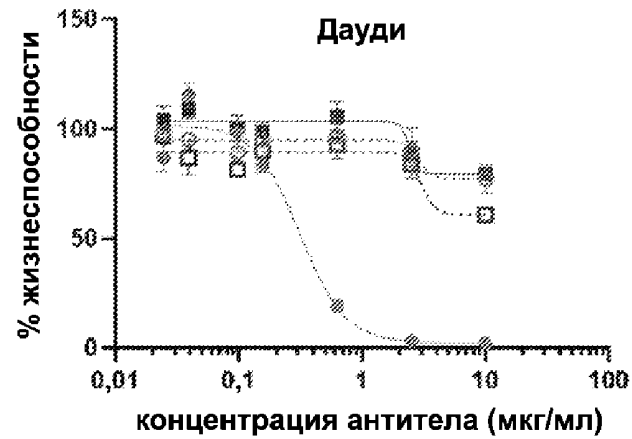
ФИГ. 13D

ФИГ. 14А

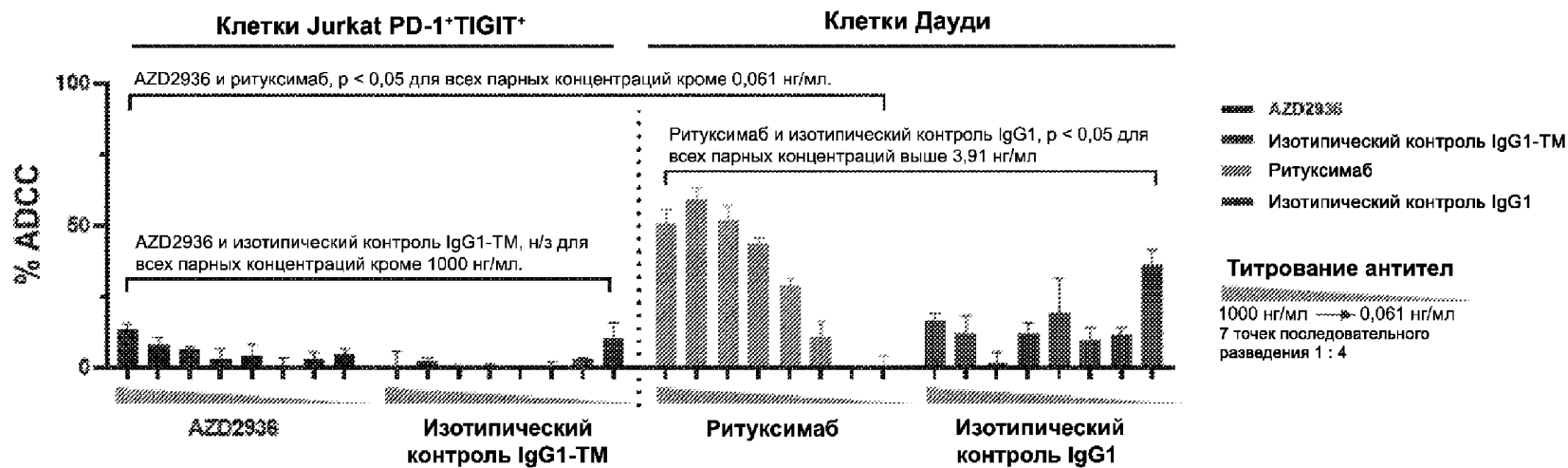


- AZD2936 — сыворотка
- AZD2936 — сыворотка HI
- Изотипический контроль IgG1-TM — сыворотка
- Изотипический контроль IgG1-TM — сыворотка HI

ФИГ. 14В



- ◆ Ритуксимаб — сыворотка
- ◇ Ритуксимаб — сыворотка HI
- Изотипический контроль IgG1 — сыворотка
- Изотипический контроль IgG1 — сыворотка HI



ФИГ. 15