

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202393054 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.02.14

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

(22) Дата подачи заявки
2022.05.04

(54) АНТИТЕЛА К TIGIT И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 63/201,536

(32) 2021.05.04

(33) US

(86) PCT/US2022/072110

(87) WO 2022/236284 2022.11.10

(71) Заявитель:
ЭЙДЖЕНУС ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Игнатович Ольга, Бушелл К. Марк,
Чанд Дхан Сидхартха, Уэнсли Бет
(US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В настоящем изобретении предусмотрены выделенные антитела, которые специфически связываются с TIGIT (например, TIGIT человека). Также предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие данные антитела, нуклеиновые кислоты, кодирующие данные антитела, векторы экспрессии и клетки-хозяева для получения данных антител, а также способы лечения субъекта с применением данных антител.

A1

202393054

202393054

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-579293EA/019

АНТИТЕЛА К TIGIT И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

1. РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США № 63/201536, поданной 4 мая 2021 г., которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

2. ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0001] Содержимое предоставленного в электронном виде списка последовательностей в текстовом файле в формате ASCII (название файла: 190498_SL; размер 39552 байта; дата создания: 28 апреля 2022 г.) включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

3. ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0002] Настоящее изобретение относится к антителам к TIGIT и способам их применения.

4. УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Белковый T-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и ITIM (TIGIT), также известный как VSIG9 или VSTM3, представляет собой трансмембранный белок I типа в суперсемействе иммуноглобулинов (Ig). Он имеет один домен Ig, трансмембранный домен I типа, один внутриклеточный иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий мотив (ITIM) и один мотив фосфорилирования, подобный хвостовому тирозину иммуноглобулина (ИТТ), и экспрессируется на активированных CD4-положительных/CD25-положительных регуляторных T-клетках (Treg), CD45RO-положительных T-клетках памяти и натуральных киллерах (NK), но не на наивных T-клетках.

[0004] CD155 (также известный как рецептор полиовируса (PVR)) на высоком уровне экспрессируется на моноцитах и дендритных клетках и способен активировать эффекторные T-клетки и NK-клетки, а также ослаблять активность Treg посредством связывания с двумя своими рецепторами CD226 и CD96. TIGIT связывается с CD155 и, как было показано, противодействует взаимодействию CD155 с CD226 и CD96, тем самым подавляя иммунную активность, опосредованную T-клетками и NK-клетками.

[0005] Принимая во внимание роль TIGIT человека в модуляции иммунных ответов, терапевтические средства, разработанные для блокирования взаимодействий лиганда TIGIT, имеют большие перспективы для лечения заболеваний, в которые вовлечено подавление иммунитета.

5. СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0006] В настоящем изобретении предусмотрены антитела, которые специфически связываются с TIGIT (например, TIGIT человека). Также предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие данные антитела, нуклеиновые кислоты, кодирующие данные антитела, векторы экспрессии и клетки-хозяева для получения

данных антител, а также способы лечения субъекта с применением данных антител.

[0007] В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIGIT человека, причем антитело содержит:

(a) VH, содержащую аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из аминокислотной последовательности VH под SEQ ID NO: 7; и/или

(b) VL, содержащую аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из аминокислотной последовательности VL под SEQ ID NO: 9,

где VH содержит лизин в аминокислотном положении 12, серин в аминокислотном положении 16, лизин в аминокислотном положении 73, серин в аминокислотном положении 76, аланин в аминокислотном положении 78 и/или аргинин в аминокислотном положении 83 соответственно, и

где VL содержит лизин в аминокислотном положении 45, глицин в аминокислотном положении 57, валин в аминокислотном положении 58 и/или аланин в аминокислотном положении 80,

причем в каждом случае нумерация выполнена в соответствии с Kabat.

[0008] В определенных вариантах осуществления:

(a) VH содержит лизин, серин, лизин, серин, аланин и аргинин в аминокислотных положениях 12, 16, 73, 76, 78 и 83 соответственно, и VL содержит лизин, глицин, валин и аланин в аминокислотных положениях 45, 57, 58 и 80 соответственно;

(b) VH содержит лизин, серин и аргинин в аминокислотных положениях 12, 16 и 83 соответственно, и VL содержит лизин и аланин в аминокислотных положениях 45 и 80 соответственно;

(c) VH содержит лизин, серин, лизин, серин, аланин и аргинин в аминокислотных положениях 12, 16, 73, 76, 78 и 83 соответственно, и VL содержит лизин и аланин в аминокислотных положениях 45 и 80 соответственно; или

(d) VH содержит лизин, серин и аргинин в аминокислотных положениях 12, 16 и 83 соответственно, и VL содержит лизин, глицин, валин и аланин в аминокислотных положениях 45, 57, 58 и 80 соответственно,

пронумерованных в соответствии с Kabat.

[0009] В определенных вариантах осуществления антитело содержит аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 под SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 и 6 соответственно.

[0010] В определенных вариантах осуществления антитело содержит аминокислотную последовательность VH под SEQ ID NO: 7 или 8. В другом варианте осуществления аминокислотная последовательность VH состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7 или 8. В другом варианте осуществления антитело содержит аминокислотную последовательность VL под SEQ ID NO: 9 или 10. В другом варианте осуществления VL состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 9 или 10.

[0011] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIGIT человека, при этом антитело содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7 или 8, и/или VL, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9 или 10. В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность VH состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7 или 8, и/или аминокислотная последовательность VL состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 9 или 10. В другом варианте осуществления антитело содержит аминокислотные последовательности VH и VL под SEQ ID NO: 7 и 9; 7 и 10; 8 и 9 или 8 и 10 соответственно. В другом варианте осуществления аминокислотные последовательности VH и VL состоят из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 7 и 9; 7 и 10; 8 и 9 или 8 и 10 соответственно.

[0012] В определенных вариантах осуществления антитело содержит константную область тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂ человека. В другом варианте осуществления антитело содержит константную область тяжелой цепи IgG₁. В другом варианте осуществления антитело содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16 или 22. В другом варианте осуществления аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG₁ содержит мутацию N297A, пронумерованную в соответствии с системой нумерации EU.

[0013] В определенных вариантах осуществления антитело содержит константную область тяжелой цепи, которая является вариантом константной области тяжелой цепи дикого типа, где вариант константной области тяжелой цепи связывается с FcγR с большей аффинностью, чем константная область тяжелой цепи дикого типа связывается с FcγR. В другом варианте осуществления FcγR представляет собой FcγRIIB или FcγRIIA.

[0014] В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG₁ содержит мутации S267E и L328F, пронумерованные в соответствии с системой нумерации EU. В другом варианте осуществления аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG₁ содержит по меньшей мере одну мутацию, выбранную из группы, состоящей из мутаций S239D, A330L и I332E, пронумерованных в соответствии с системой нумерации EU. В другом варианте осуществления аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG₁ содержит мутации S239D, A330L и I332E, пронумерованные в соответствии с системой нумерации EU.

[0015] В определенных вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 11, 12, 19 или 20. В другом варианте осуществления тяжелая цепь состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 11, 12, 19 или 20. В другом варианте осуществления антитело содержит константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 17 или 18. В другом варианте осуществления

антитело содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 13, 14, 15 или 21. В другом варианте осуществления легкая цепь состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 13, 14, 15 или 21.

[0016] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIGIT человека, где антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 11, 12, 19 или 20, и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 13, 14, 15 или 21.

[0017] В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность тяжелой цепи состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 11, 12, 19 или 20, и/или аминокислотная последовательность легкой цепи состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 13, 14, 15 или 21. В другом варианте осуществления тяжелая цепь и легкая цепь содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 11 и 13; 11 и 14; 11 и 15; 11 и 21; 12 и 13; 12 и 14; 12 и 15; 12 и 21; 19 и 13; 19 и 14; 19 и 15; 19 и 21; 20 и 13; 20 и 14; 20 и 15 или 20 и 21 соответственно. В другом варианте осуществления тяжелая цепь и легкая цепь состоят из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 11 и 13; 11 и 14; 11 и 15; 11 и 21; 12 и 13; 12 и 14; 12 и 15; 12 и 21; 19 и 13; 19 и 14; 19 и 15; 19 и 21; 20 и 13; 20 и 14; 20 и 15 или 20 и 21 соответственно.

[0018] В определенных вариантах осуществления антитело является полиспецифическим. В другом варианте осуществления выделенное антитело конъюгировано с цитотоксическим средством, цитостатическим средством, токсином, радионуклидом или детектируемой меткой. В другом варианте осуществления выделенное антитело конъюгировано с антителом.

[0019] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен выделенный полинуклеотид, кодирующий VH и/или VL или тяжелую цепь и/или легкую цепь выделенного антитела, раскрытого в данном документе.

[0020] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен вектор, содержащий полинуклеотид, раскрытый в данном документе.

[0021] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрена рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая:

- (a) полинуклеотид, раскрытый в данном документе;
- (b) вектор, раскрытый в данном документе;
- (c) полинуклеотид, кодирующий VH и VL или тяжелую цепь и легкую цепь выделенного антитела, раскрытого в данном документе;
- (d) вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий VH и VL или тяжелую цепь и легкую цепь выделенного антитела, раскрытого в данном документе;
- (e) первый полинуклеотид, кодирующий VH или тяжелую цепь выделенного антитела, раскрытого в данном документе, и второй полинуклеотид, кодирующий VL или легкую цепь выделенного антитела, раскрытого в данном документе; или

(f) первый вектор, содержащий первый полинуклеотид, кодирующий VH или тяжелую цепь выделенного антитела, раскрытого в данном документе, и второй вектор, содержащий второй полинуклеотид, кодирующий VL или легкую цепь выделенного антитела, раскрытого в данном документе.

[0022] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая выделенное антитело, раскрытое в данном документе, полинуклеотид, раскрытый в данном документе, вектор, раскрытый в данном документе, или клетку-хозяина, раскрытую в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество.

[0023] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ получения выделенного антитела, причем способ включает культивирование клетки-хозяина, раскрытой в данном документе, в подходящих условиях, так что экспрессируется полинуклеотид и продуцируется выделенное антитело.

[0024] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ получения выделенного антитела, при этом способ предусматривает экспрессию в клетке:

(a) первого полинуклеотида, кодирующего VH антитела, раскрытого в данном документе, и второго полинуклеотида, кодирующего VL антитела, раскрытого в данном документе; или

(b) первого полинуклеотида, кодирующего тяжелую цепь антитела, раскрытого в данном документе, и второго полинуклеотида, кодирующего легкую цепь антитела, раскрытого в данном документе,

в подходящих условиях, так что экспрессируются полинуклеотиды и продуцируется антитело.

[0025] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ усиления иммунного ответа у субъекта, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества выделенного антитела, раскрытого в данном документе, полинуклеотида, раскрытого в данном документе, вектора, раскрытого в данном документе, клетки-хозяина, раскрытой в данном документе, или фармацевтической композиции, раскрытой в данном документе.

[0026] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения рака у субъекта, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества выделенного антитела, раскрытого в данном документе, полинуклеотида, раскрытого в данном документе, вектора, раскрытого в данном документе, клетки-хозяина, раскрытой в данном документе, или фармацевтической композиции, раскрытой в данном документе.

[0027] В определенных вариантах осуществления выделенное антитело, полинуклеотид, вектор, клетку-хозяина или фармацевтическую композицию вводят системно, внутривенно, подкожно, внутрь опухоли или доставляют в дренирующий опухоль лимфатический узел.

[0028] В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает введение дополнительного терапевтического средства субъекту.

[0029] В определенных вариантах осуществления дополнительным терапевтическим средством является химиотерапевтическое средство.

[0030] В определенных вариантах осуществления дополнительным терапевтическим средством является средство, нацеливающееся на контрольную точку иммунного ответа. В другом варианте осуществления средство, нацеливающееся на контрольную точку иммунного ответа, выбрано из группы, состоящей из антагонистического антитела к PD-1, антагонистического антитела к PD-L1, антагонистического антитела к PD-L2, антагонистического антитела к CTLA-4, антагонистического антитела к TIM-3, антагонистического антитела к LAG-3, антагонистического антитела к VISTA, антагонистического антитела к TIGIT, антагонистического антитела к CEACAM1, антагонистического антитела к CD96, агонистического антитела к GITR и агонистического антитела к OX40. В другом варианте осуществления дополнительным терапевтическим средством является антитело к PD-1, где необязательно антителом к PD-1 является пембролизумаб или ниволумаб.

[0031] В определенных вариантах осуществления дополнительным терапевтическим средством является ингибитор индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO). В другом варианте осуществления ингибитор выбран из группы, состоящей из эпакадостата, F001287, индоксимода и NLG919.

[0032] В определенных вариантах осуществления дополнительным терапевтическим средством является вакцина. В другом варианте осуществления вакцина содержит комплекс белок теплового шока-пептид (HSPPC), содержащий белок теплового шока в комплексе с антигенным пептидом. В другом варианте осуществления белок теплового шока представляет собой hsc70 и образует комплекс с опухолеассоциированным антигенным пептидом. В другом варианте осуществления белок теплового шока представляет собой белок gp96 и образует комплекс с опухолеассоциированным антигенным пептидом, где необязательно HSPPC происходит из опухоли, полученной от субъекта.

[0033] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения инфекционного заболевания у субъекта, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества выделенного антитела, раскрытого в данном документе, полинуклеотида, раскрытого в данном документе, вектора, раскрытого в данном документе, клетки-хозяина, раскрытой в данном документе, или фармацевтической композиции, раскрытой в данном документе.

6. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0034] На **фиг. 1А** и **фиг. 1В** представлены кривые катионообменной хроматографии, показывающие время элюирования ВА159 (фиг. 1А) и эталонного антитела к TIGIT (фиг. 1В). Поглощение при длине волны 280 нм нанесено на график в зависимости от времени удерживания.

[0035] На **фиг. 2А** и **фиг. 2В** представлены кривые термического плавления, показывающие разворачивание ВА159 (фиг. 2А) и эталонного антитела к TIGIT (фиг. 2В).

Барицентрическое среднее собственной флуоресценции нанесено на график в зависимости от температуры.

[0036] На **фиг. 3А и фиг. 3В** представлены кривые термического плавления, показывающие агрегацию ВА159 (фиг. 3А) и эталонного антитела к TIGIT (фиг. 3В). Статическое светорассеяние при длине волны 266 нм нанесено на график в зависимости от температуры.

[0037] На **фиг. 4А-фиг. 4D** представлены кривые аффинной хроматографии FcRn, показывающие время элюирования ВА159 (фиг. 4А), эталонного антитела к TIGIT (фиг. 4В), контрольного mAb IgG1 (фиг. 4С) и поликлональной смеси IgG (фиг. 4D). Поглощение при длине волны 280 нм нанесено на график в зависимости от времени удерживания.

[0038] На **фиг. 5А и фиг. 5В** представлены электрофореграммы капиллярного электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия (CE SDS), показывающие степень образования межцепочечных дисульфидных связей у ВА159 (фиг. 5А) и ВА160 (фиг. 5В) в невозстанавливающих условиях. Показана флуоресценция молекул, анализируемых при разных размерах.

[0039] На **фиг. 6А и фиг. 6В** представлены кривые катионообменной хроматографии, показывающие время элюирования ВА159 (фиг. 6А) и ВА160 (фиг. 6В). Поглощение при длине волны 280 нм нанесено на график в зависимости от времени удерживания.

[0040] На **фиг. 7А и фиг. 7В** представлены кривые термического плавления, показывающие разворачивание ВА159 (фиг. 7А) и ВА160 (фиг. 7В). Барицентрическое среднее собственной флуоресценции нанесено на график в зависимости от температуры.

[0041] На **фиг. 8А и фиг. 8В** представлены кривые термического плавления, показывающие агрегацию ВА159 (фиг. 8А) и ВА160 (фиг. 8В). Статическое светорассеяние при длине волны 266 нм нанесено на график в зависимости от температуры.

[0042] На **фиг. 9А-фиг. 9С** представлена серия кривых эксклюзионной хроматографии, показывающих время элюирования для ВА159 (фиг. 9А), ВА160 (фиг. 9В) и эталонного антитела к TIGIT (фиг. 9С). Поглощение при длине волны 214 нм нанесено на график в зависимости от времени удерживания.

[0043] На **фиг. 10А-фиг. 10С** представлена серия графиков массового распределения динамического светорассеяния, показывающих рассчитанный средний гидродинамический диаметр для ВА159 (фиг. 10А), ВА160 (фиг. 10В) и эталонного антитела к TIGIT (фиг. 10С). Каждый эксперимент проводили в двух повторностях, и оба показаны на одном графике. Амплитуда нанесена на график в зависимости от гидродинамического диаметра.

[0044] На **фиг. 11А-фиг. 11С** представлена серия хроматографических кривых гидрофобного взаимодействия, показывающих время элюирования для ВА159 (фиг. 11А), ВА160 (фиг. 11В) и эталонного антитела к TIGIT (фиг. 11С). Поглощение при длине

волны 229 нм нанесено на график в зависимости от времени удерживания.

[0045] На **фиг. 12А-12І** представлена серия электрофореграмм CE SDS в невосстанавливающих условиях, показывающих любые изменения в межцепочечных дисульфидных связях для ВА159 (фиг. 12А-12С), ВА160 (фиг. 12D-12F) и эталонном антителе к TIGIT (фиг. 12G-12I) при отсутствии стрессового воздействия, выдерживании при высокой температуре и повторном замораживании-оттаивании. Показана флуоресценция молекул, анализируемых при разных размерах.

[0046] На **фиг. 13А-фиг. 13І** представлена серия электрофореграмм CE SDS в восстанавливающих условиях, показывающих любое отсечение ВА159 (фиг. 13А-фиг. 13С), ВА160 (фиг. 13D-фиг. 13F) и эталонного антитела к TIGIT (фиг. 13G-фиг. 13I) при отсутствии стрессового воздействия, выдерживании при высокой температуре и повторном замораживании-оттаивании. Показана флуоресценция молекул, анализируемых при разных размерах.

[0047] На **фиг. 14А-фиг. 14І** представлена серия кривых эксклюзионной хроматографии, показывающих время элюирования ВА159 (фиг. 14А-фиг. 14С), ВА160 (фиг. 14D-фиг. 14F) и эталонного антитела к TIGIT (фиг. 14G-фиг. 14I) при отсутствии стрессового воздействия, выдерживании при высокой температуре и повторном замораживании-оттаивании. Поглощение при длине волны 214 нм нанесено на график в зависимости от времени удерживания.

[0048] На **фиг. 15А и фиг. 15В** представлены графики, показывающие способность ВА159 и антитела изотипического контроля связываться с активированными РВМС здорового донора в диапазоне концентраций антител, как измерено по средней интенсивности флуоресценции (MFI). На **фиг. 15А** показано связывание с CD4⁺ Т-клетками, а на **фиг. 15В** показано связывание с CD8⁺ Т-клетками.

[0049] На **фиг. 16А и фиг. 16В** представлены графики, показывающие способность ВА159 и антитела изотипического контроля индуцировать экспрессию люциферазы в качестве заменителя активации TCR и активации пути CD226 в репортерном анализе, в котором репортерные клетки Jurkat культивировали совместно с клетками СНО, сконструированными для экспрессии РVР и активатора TCR (искусственные антигенпрезентирующие клетки (аАРС)). Экспрессию люциферазы, показанную в относительных световых единицах (RLU), измеряли в присутствии диапазона доз ВА159 или изотипического антитела. На **фиг. 16А** и **фиг. 16В** представлены независимые эксперименты, проведенные в два разных дня.

[0050] На **фиг. 17** представлен график, показывающий способность ВА159, ВА160 и антитела изотипического контроля блокировать связывание TIGIT, экспрессируемого на клетках Jurkat, с РVР, экспрессируемым на клетках СНО. Блокирование выражается в относительных световых единицах (RLU) в диапазоне концентраций антител.

[0051] На **фиг. 18А-фиг. 18С** представлена серия графиков, показывающих способность ВА159, ВА260, ВА261, ВА262 и антитела изотипического контроля стимулировать секрецию IL-2 из РВМС, простимулированных SEA, в диапазоне

концентраций антител. Каждая панель представляет отдельного донора.

[0052] На **фиг. 19А и фиг. 19В** представлены графики, показывающие способность ВА159, ВА260, ВА261, ВА262 и антитела изотипического контроля стимулировать секрецию IL-2 из РВМС, простимулированных SEA, в диапазоне концентраций антител в присутствии или в отсутствие антитела к PD-1. Каждая панель представляет отдельного донора.

[0053] На **фиг. 20А и фиг. 20В** представлены графики, показывающие способность ВА159, ВА160 и антитела изотипического контроля стимулировать секрецию IL-2 из РВМС, простимулированных SEA, в диапазоне концентраций антител. Каждая панель представляет отдельного донора.

7. ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0054] В настоящем изобретении предусмотрены выделенные антитела к TIGIT. Также предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие данные антитела, нуклеиновые кислоты, кодирующие данные антитела, векторы экспрессии и клетки-хозяева для получения данных антител, а также способы лечения субъекта с применением данных антител. Описанные в данном документе антитела особенно применимы для усиления активации иммунных клеток и, следовательно, применимы для лечения рака у субъекта или лечения или предупреждения инфекционного заболевания у субъекта.

7.1 Определения

[0055] Применяемый в данном документе термин «TIGIT» относится к T-клеточному иммунорецептору с доменами Ig и ITIM (также известному как VSIG9 или VSTM3), который у людей кодируется геном TIGIT. Применяемый в данном документе термин «TIGIT человека» относится к белку TIGIT, кодируемому геном TIGIT человека дикого типа (например, с номером доступа в GenBank™ NM_173799.3), или внеклеточному домену такого белка. Иллюстративная аминокислотная последовательность внеклеточного домена зрелого белка TIGIT человека представлена под SEQ ID NO: 23. Иллюстративная аминокислотная последовательность внеклеточного домена зрелого белка TIGIT яванского макака представлена под SEQ ID NO: 24.

[0056] Применяемые в данном документе термины «антитело» и «антитела» включают полноразмерные антитела, антигенсвязывающие фрагменты полноразмерных антител и молекулы, содержащие CDR, VH-области и/или VL-области антител. Примеры антител включают без ограничения моноклональные антитела, рекомбинантно полученные антитела, моноспецифические антитела, полиспецифические антитела (включая биспецифические антитела), человеческие антитела, гуманизированные антитела, химерные антитела, иммуноглобулины, синтетические антитела, тетрамерные антитела, содержащие две молекулы тяжелой цепи и две молекулы легкой цепи, мономер легкой цепи антитела, мономер тяжелой цепи антитела, димер легких цепей антитела, димер тяжелых цепей антитела, пару легкая цепь антитела-тяжелая цепь антитела, интратела, гетероконъюгированные антитела, конъюгаты антитело-лекарственное средство, однодоменные антитела, моновалентные антитела, одноцепочечные антитела

или одноцепочечные Fv (scFv), камелизированные антитела, аффитела, Fab-фрагменты, F(ab')₂-фрагменты, связанные дисульфидной связью Fv (sdFv), антиидиотипические (анти-Id) антитела (включая, например, анти-анти-Id антитела) и антигенсвязывающие фрагменты любого из вышеперечисленного. В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе антитела относятся к популяциям поликлональных антител. Антитела могут представлять собой молекулу иммуноглобулина любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY), любого класса (например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ или IgA₂) или любого подкласса (например, IgG_{2a} или IgG_{2b}). В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе антитела представляют собой антитела типа IgG или его класса (например, IgG₁ или IgG₄ человека) или подкласса. В конкретном варианте осуществления антитело является гуманизированным моноклональным антителом. В другом конкретном варианте осуществления антитело является человеческим моноклональным антителом.

[0057] «Полиспецифические антитела» представляют собой антитела, (например, биспецифические антитела) которые специфически связываются с двумя или более различными антигенами или с двумя или более разными областями одного антигена. Полиспецифические антитела включают биспецифические антитела, которые содержат два разных антигенсвязывающих сайта (исключая область Fc). Полиспецифические антитела могут включать, например, рекомбинантно полученные антитела, человеческие антитела, гуманизированные антитела, антитела с измененной поверхностью, химерные антитела, иммуноглобулины, синтетические антитела, тетрамерные антитела, содержащие две молекулы тяжелой цепи и две молекулы легкой цепи, мономер легкой цепи антитела, гетероконъюгированные антитела, связанные одноцепочечные антитела или связанные одноцепочечные Fv (scFv), камелизированные антитела, аффитела, связанные Fab-фрагменты, F(ab')₂-фрагменты, химически связанные Fv и связанные дисульфидной связью Fv (sdFv). Полиспецифические антитела могут представлять собой молекулу иммуноглобулина любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY), любого класса (например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ или IgA₂) или любого подкласса (например, IgG_{2a} или IgG_{2b}). В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе полиспецифические антитела представляют собой антитела типа IgG или его класса (например, IgG₁, IgG₂ или IgG₄ человека) или подкласса.

[0058] Применяемый в данном документе термин «CDR» или «определяющая комплементарность область» означает несмежные антиген-связывающие сайты, встречающиеся в пределах переменных областей полипептидов тяжелой и легкой цепей. Данные конкретные области были описаны, например, в Kabat *et al.*, J. Biol. Chem. 252, 6609-6616 (1977) и Kabat *et al.*, Sequences of protein of immunological interest. (1991), в Chothia *et al.*, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) и в MacCallum *et al.*, J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, где определения включают перекрывающиеся аминокислотные остатки или их подгруппы при сравнении друг с другом. В определенных вариантах осуществления

термин «CDR» представляет собой CDR, как определено в MacCallum *et al.*, J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996) и Martin A. «Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains» в *Antibody Engineering*, Kontermann and Dübel, eds., Chapter 31, pp. 422-439, Springer-Verlag, Berlin (2001). В определенных вариантах осуществления термин «CDR» представляет собой CDR, как определено в Kabat *et al.*, J. Biol. Chem. 252, 6609-6616 (1977) и Kabat *et al.*, Sequences of protein of immunological interest. (1991). В определенных вариантах осуществления CDR тяжелой цепи и CDR легкой цепи антитела определяются с использованием разных условных обозначений. В определенных вариантах осуществления CDR тяжелой цепи и/или CDR легкой цепи определяют путем проведения структурного анализа антитела и выявления остатков в варибельной(-ых) области(-ях), которая(-ые), согласно предположениям, вступает(-ют) в контакт с эпитопной областью целевой молекулы (например, TIGIT человека и/или яванского макака). CDRH1, CDRH2 и CDRH3 обозначают CDR тяжелой цепи, а CDRL1, CDRL2 и CDRL3 обозначают CDR легкой цепи.

[0059] Применяемые в данном документе термины «варибельная область» и «варибельный домен» используются взаимозаменяемо и они общеизвестны в данной области техники. Варибельная область обычно относится к части антитела, обычно к части легкой или тяжелой цепи, как правило, к аминоконцевым 110-120 аминокислотам или 110-125 аминокислотам в зрелой тяжелой цепи и к приблизительно 90-115 аминокислотам в зрелой легкой цепи, которые сильно отличаются по последовательности среди антител и используются для связывания и формирования специфичности конкретного антитела к его конкретному антигену. Варибельность последовательности сосредоточена в тех областях, которые называются определяющими комплементарность областями (CDR), тогда как более высококонсервативные области в варибельной области называются каркасными областями (FR). Без привязки к какому-либо конкретному механизму или теории полагают, что CDR легкой и тяжелой цепей в первую очередь ответственны за взаимодействие и специфичность антитела с антигеном. В определенных вариантах осуществления варибельная область является человеческой варибельной областью. В определенных вариантах осуществления варибельная область содержит CDR грызуна или мыши и человеческие каркасные области (FR). В определенных вариантах осуществления варибельная область является варибельной областью примата (например, отличного от человека примата). В определенных вариантах осуществления варибельная область содержит CDR грызуна или мыши и каркасную область (FR) примата (например, отличного от человека примата).

[0060] Применяемые в данном документе термины «VH» и «VL» относятся к варибельным областям тяжелой и легкой цепей антитела соответственно, как описано в Kabat *et al.*, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest (NIH Publication No. 91-3242, Bethesda), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0061] Применяемый в данном документе термин «константная область» является

общеизвестным в данной области техники. Константная область представляет собой часть антитела, например, карбоксиконцевую часть легкой и/или тяжелой цепи, которая непосредственно не участвует в связывании антитела с антигеном, но может проявлять различные эффекторные функции, такие как взаимодействие с Fc-рецептором (например, Fc-гамма-рецептором).

[0062] Применяемый в данном документе термин «тяжелая цепь», если он используется в отношении антитела, может относиться к любому отдельному типу, например, альфа (α), дельта (δ), эпсилон (ϵ), гамма (γ) и мю (μ), на основе аминокислотной последовательности константной области, который дает начало антителам классов IgA, IgD, IgE, IgG и IgM соответственно, включая подклассы IgG, например, IgG₁, IgG₂, IgG₃ и IgG₄.

[0063] Применяемый в данном документе термин «легкая цепь», если он используется в отношении антитела, может относиться к любому отдельному типу, например, каппа (κ) или лямбда (λ), на основе аминокислотной последовательности константной области. Аминокислотные последовательности легкой цепи хорошо известны в данной области техники. В конкретных вариантах осуществления легкая цепь является человеческой легкой цепью.

[0064] Применяемые в данном документе термины «специфически связывается», «специфически распознает», «иммуноспецифически связывается» и «иммуноспецифически распознает» являются аналогичными терминами в контексте антител и относятся к молекулам, которые связываются с антигеном (например, эпитопом или иммунным комплексом), в том смысле, как такое связывание понимается специалистом в данной области техники. Например, молекула, которая специфически связывается с антигеном, может связываться с другими пептидами или полипептидами, обычно с более низкой аффинностью, как определено, например, с помощью иммуноанализов, BIAcore[®], KinExA 3000 (Sapidyne Instruments, Бойсе, Айдахо, США) или других анализов, известных из уровня техники. В конкретном варианте осуществления молекулы, которые специфически связываются с антигеном, связываются с антигеном с K_A , которая составляет по меньшей мере $2 \log$ (например, степени 10), $2,5 \log$, $3 \log$, $4 \log$ или больше, чем K_A , когда молекулы неспецифически связываются с другим антигеном.

[0065] Применяемый в данном документе термин «система нумерации EU» относится к условным обозначениям по системе нумерации EU константных областей антитела, которая описана в Edelman, G.M. *et al.*, Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85 (1969) и Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health and Human Services, 5th edition, 1991, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0066] Применяемые в данном документе термины «лечить», «подвергать лечению» и «лечение» относятся к терапевтическим или предупредительным мерам, описанным в данном документе. Способы «лечения» включают введение антитела субъекту, имеющему заболевание или нарушение или предрасположенному к такому

заболеванию или нарушению, для предупреждения, лечения, отсрочки, уменьшения тяжести или облегчения одного или более симптомов заболевания или нарушения, или рецидивирующего заболевания или нарушения, или для продления срока жизни субъекта сверх того, что ожидается в отсутствие такого лечения.

[0067] Применяемый в данном документе термин «эффективное количество» в контексте введения средства терапии субъекту относится к количеству средства терапии, которое обеспечивает требуемый профилактический или терапевтический эффект.

[0068] Применяемый в данном документе термин «субъект» охватывает любого человека или отличного от человека животного. В определенных вариантах осуществления субъект является человеком или отличным от человека млекопитающим. В определенных вариантах осуществления субъект является человеком.

[0069] Применяемый в данном документе по отношению к антителу или полинуклеотиду термин «выделенный» относится к антителу или полинуклеотиду, отделенным от одного или более загрязнителей (например, полипептидов, полинуклеотидов, липидов или углеводов и т. д.), которые присутствуют в природном источнике антитела или полинуклеотида. Все случаи «выделенных антител», описанных в данном документе, дополнительно предполагаются как антитела, которые могут быть, но могут и не быть, выделенными. Все случаи «выделенных полинуклеотидов», описанных в данном документе, дополнительно предполагаются как полинуклеотиды, которые могут быть, но могут и не быть, выделенными. Все случаи «антител», описанных в данном документе, дополнительно предполагаются как антитела, которые могут быть, но могут и не быть, выделенными. Все случаи «полинуклеотидов», описанных в данном документе, дополнительно предполагаются как полинуклеотиды, которые могут быть, но могут и не быть, выделенными.

[0070] Определение «процента идентичности» между двумя последовательностями (например, аминокислотными последовательностями или последовательностями нуклеиновых кислот) можно осуществить с помощью математического алгоритма. Конкретным неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения двух последовательностей, является алгоритм из Karlin S & Altschul SF (1990) PNAS 87: 2264-2268, модифицированный как в Karlin S & Altschul SF (1993) PNAS 90: 5873-5877, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Такой алгоритм включен в программы NBLAST и XBLAST из Altschul SF *et al.*, (1990) J Mol Biol 215: 403, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Поисковые запросы по нуклеотидным последовательностям BLAST можно осуществить с помощью набора параметров программы для нуклеотидных последовательностей NBLAST, например, показатель=100, длина слова=12 для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных молекуле нуклеиновой кислоты, описанной в данном документе. Поисковые запросы по белковым последовательностям BLAST можно выполнить с помощью набора параметров программы XBLAST, например, показателя 50, длины слова=3 для получения

аминокислотных последовательностей, гомологичных белковой молекуле, описанной в данном документе. Для получения результатов выравнивания с гэпами для целей сравнения можно использовать Gapped BLAST, который описан в Altschul SF *et al.*, (1997) *Nuc Acids Res* 25: 3389-3402, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В качестве альтернативы для проведения итерационного поиска, который позволяет выявить отдаленные связи между молекулами, можно применять PSI BLAST (*там же*). При использовании программ BLAST, Gapped BLAST и PSI Blast можно использовать параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST) (см., например, Национальный центр биотехнологической информации (NCBI) во всемирной сети на сайте ncbi.nlm.nih.gov). Другим конкретным неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения последовательностей, является алгоритм из Myers and Miller, 1988, *CABIOS* 4:11-17, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Такой алгоритм включен в программу ALIGN (версии 2.0), которая является частью пакета программного обеспечения для выравнивания последовательностей GCG. При использовании программы ALIGN для сравнения аминокислотных последовательностей можно применять таблицу матрицы замен остатков PAM120, штраф за удлинение гэта 12 и штраф за гэта 4.

[0071] Процент идентичности между двумя последовательностями можно определить с использованием методик, подобных описанным выше, допускающих или не допускающих гэпы. При вычислении процента идентичности, как правило, учитывают только точные совпадения.

7.2 Антитела к TIGIT

[0072] В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрены антитела, которые специфически связываются с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака). Аминокислотные последовательности иллюстративных антител изложены в таблице 1.

Таблица 1. Аминокислотные последовательности иллюстративных антител к TIGIT.

Описание	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
BA159 BA160 BA260 BA261 BA262 HCDR1	SYGIS	1

BA159 BA160 BA260 BA261 BA262 HCDR2	GITPPFFNRVDVAEKFAQ	2
BA159 BA160 BA260 BA261 BA262 HCDR3	DLRRGGVGDADFID	3
BA159 BA160 BA260 BA261 BA262 LCDR1	TGTSSDVGSHNYVS	4
BA159 BA160 BA260 BA261 BA262 LCDR2	EVSYRPS	5
BA159 BA160 BA260 BA261 BA262 LCDR3	SSYTPSSATV	6
BA159 BA160 BA261 VH	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFASYGISWVR QAPGQGLEWMGGITPPFFNRVDVAEKFAQGRVTITADKST STAYIELSSLRSEDVAVYYCARDLRRGGVGDADFIDWGR GTLVTVSS	7

BA260 BA262 VH	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFASYGISWVR QAPGQGLEWMGGITPFFNRVDVAEKFAQGRVTITADTST NTVYIELSSLRSEDNAVYYCARDLRRGGVGDADFIDWGR GTLVTVSS	8
BA159 BA160 BA262 VL	QCOLBQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGSHNYVSWYQ QHPGKAPKLMIEVSYRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTIS GLQAEDEADYYCSSYTPSSATVFGAGTKLTVL	9
BA260 BA261 VL	QCOLBQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGSHNYVSWYQ QHPGKAPKLMIEVSYRPSSEISNRFSGSKSGNTASLTISG LQAEDEADYYCSSYTPSSATVFGAGTKLTVL	10
BA159 BA160 BA261 тяжелая цепь	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFASYGISWVR QAPGQGLEWMGGITPFFNRVDVAEKFAQGRVTITADKST STAYIELSSLRSEDNAVYYCARDLRRGGVGDADFIDWGR GTLVTVSSASTKTPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKTKAK IQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	11
BA260 BA262 тяжелая цепь	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFASYGISWVR QAPGQGLEWMGGITPFFNRVDVAEKFAQGRVTITADTST NTVYIELSSLRSEDNAVYYCARDLRRGGVGDADFIDWGR GTLVTVSSASTKTPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKTKAK IQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	12
BA159 BA262 легкая цепь	QCOLBQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGSHNYVSWYQ QHPGKAPKLMIEVSYRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTIS GLQAEDEADYYCSSYTPSSATVFGAGTKLTVLGQPKAA PSVTLFPPSCM.LQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKAD SSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRS YSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	13
BA160 легкая цепь	QCOLBQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGSHNYVSWYQ QHPGKAPKLMIEVSYRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTIS GLQAEDEADYYCSSYTPSSATVFGAGTKLTVLGQPKAA PSVTLFPPSCM.LQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKAD SSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRS YSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC	14

BA260 BA261 легкая цепь	QCOЛЬQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGSHNYVSWYQ QHFGKAPKLMIEVSYRPSSEISNRFSGSKSGNTASLTISG LQAEDEADYYCSSYTPSSATVFGAGTKLTVLGQPKAAP SVTLFPPSCM.LQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADS SPVKAGVETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRS YSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	15
BA159 BA160 BA260 BA261 BA262 константная область тяжелой цепи	ASTKTPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKTKISKAKTQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	16
BA159 BA260 BA261 BA262 константная область легкой цепи	GQPKAAPSVTLFPPSCM.LQANKATLVCLISDFYPGAVT VAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPE QWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	17
BA160 константная область легкой цепи	GQPKAAPSVTLFPPSCM.LQANKATLVCLISDFYPGAVT VAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPE QWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC	18
BA159 BA160 BA261 тяжелая цепь дельта К	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFASYGISWVR QAPGGLEWMGGITPFFNRVDVAEKFGGRVTITADKST STAYIELSSLRSEDTAVYYCARDLRRGGVGDADFIDWGR GTLVTVSSASTKTPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKTKISKAK TQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	19

BA260 BA262 тяжелая цепь дельта К	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFASYGISWVR QAPGQGLEWMGGITPFFNRVDVAEKFGQGRVTITADTST NTVYIELSSLRSEDNAVYYCARDLRRGGVGDADFIDWGR GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKTKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	20
BA260 BA261 легкая цепь дельта S	QCOLVQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGSHNYVSWYQ QHPGKAPKLMIEVSYRPSSEISNRFSGSKSGNTASLTISG LQAEDEADYYCSSYTPSSATVFGAGTKLTVLGQPKAAP SVTLFPPSCM.LQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADS SPVKAGVETTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSRS YSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC	21
BA159 BA160 BA260 BA261 BA262 константная область тяжелой цепи дельта К	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKTKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG	22

Таблица 2. Иллюстративные последовательности TIGIT.

Описание	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
Иллюстративный внеклеточный домен TIGIT человека	MMTGTIETTGNISAIEKFGSIIHQCHLSSTTAQVTQVN WEQQDQLLAICNADLQWHISPSFKDRVAPGPGLGLT LQSLTVNDTGEYFCIYHTYDPDGTGRIFLEVLESSV AEHGARFQ	23
Иллюстративный внеклеточный домен TIGIT яванского макака	MMTGTIETTGNISAKKFGSVILQCHLSSTMAQVTQV NWEQHDHSLAIRNAELGWHIYPAFKDRVAPGPGL GLTLQSLTMNDTGEYFCTYHTYDPDGTGRIFLEV ESSVAEHSARFQ	24

[0073] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), при этом антитело содержит домен VH, содержащий одну, две или все три CDR домена VH, изложенные в таблице 1. В определенных вариантах осуществления антитело содержит CDRH1 домена VH, изложенную в таблице 1. В определенных вариантах осуществления антитело содержит CDRH2 домена VH, изложенную в таблице 1. В определенных вариантах осуществления

антитело содержит CDRH3 домена VH, изложенную в таблице 1.

[0074] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), при этом антитело содержит домен VL, содержащий одну, две или все три CDR домена VL, раскрытые в таблице 1. В определенных вариантах осуществления антитело содержит CDRL1 домена VL, изложенную в таблице 1. В определенных вариантах осуществления антитело содержит CDRL2 домена VL, изложенную в таблице 1. В определенных вариантах осуществления антитело содержит CDRL3 домена VL, изложенную в таблице 1.

[0075] Отдельные CDR антитела, раскрытые в данном документе, могут быть определены в соответствии с любой схемой нумерации CDR, известной в данной области техники.

[0076] В определенных вариантах осуществления одна или более CDR антитела, раскрытые в данном документе, могут быть определены в соответствии с публикациями Kabat *et al.*, J. Biol. Chem. 252, 6609-6616 (1977) и Kabat *et al.*, Sequences of protein of immunological interest (1991), каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0077] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены антитела, которые специфически связываются с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) и содержат CDR антитела, раскрытые в данном документе в таблице 1, как определено по схеме нумерации Kabat.

[0078] В определенных вариантах осуществления одна или более CDR антитела, раскрытого в данном документе, могут быть определены в соответствии со схемой нумерации Chothia, которая касается расположения структурных петель иммуноглобулина (см., например, Chothia C & Lesk AM, (1987), J Mol Biol 196: 901-917; Al-Lazikani B *et al.*, (1997) J Mol Biol 273: 927-948; Chothia C *et al.*, (1992) J Mol Biol 227: 799-817; Tramontano A *et al.*, (1990) J Mol Biol 215(1): 175-82; и патент США № 7709226, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

[0079] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены антитела, которые специфически связываются с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) и содержат CDR антитела, раскрытые в данном документе в таблице 1, как определено по системе нумерации Chothia.

[0080] В определенных вариантах осуществления одна или более CDR антитела, раскрытого в данном документе, могут быть определены в соответствии с MacCallum RM *et al.*, (1996) J Mol Biol 262: 732-745, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. См. также, например, Martin A. «Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains», в *Antibody Engineering*, Kontermann and Dübel, eds., Chapter 31, pp. 422-439, Springer-Verlag, Berlin (2001), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0081] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении

предусмотрены антитела, которые специфически связываются с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) и содержат CDR антитела, раскрытые в данном документе в таблице 1, как определено по системе нумерации MacCallum.

[0082] В определенных вариантах осуществления CDR антитела, раскрытого в данном документе, могут быть определены в соответствии с системой нумерации IMGT, как описано в следующих публикациях: Lefranc M-P, (1999) *The Immunologist* 7: 132-136; Lefranc M-P *et al.*, (1999) *Nucleic Acids Res* 27: 209-212, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте; и Lefranc M-P *et al.*, (2009) *Nucleic Acids Res* 37: D1006-D1012.

[0083] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены антитела, которые специфически связываются с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) и содержат CDR антитела, раскрытые в данном документе в таблице 1, как определено по системе нумерации IMGT.

[0084] В определенных вариантах осуществления CDR антитела, раскрытого в данном документе, могут быть определены в соответствии со схемой нумерации AbM, которая касается гипервариабельных областей AbM, которые представляют компромисс между CDR по Kabat и структурными петлями по Chothia и используются программным обеспечением для моделирования антител AbM от Oxford Molecular (Oxford Molecular Group, Inc.), включенным в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0085] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены антитела, которые специфически связываются с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) и содержат CDR антитела, раскрытые в данном документе в таблице 1, как определено по схеме нумерации AbM.

[0086] В определенных вариантах осуществления CDR антитела, раскрытого в данном документе, могут быть определены в соответствии с системой нумерации AНo, как описано в Honegger and Plückthun, A., *J. Mol. Biol.* 309:657-670 (2001), включенной в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0087] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены антитела, которые специфически связываются с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) и содержат CDR антитела, раскрытые в данном документе в таблице 1, как определено по системе нумерации AНo.

[0088] В определенных вариантах осуществления каждая из отдельных CDR антитела, раскрытого в данном документе, определена независимо в соответствии с одной из схем нумерации по Kabat, Chothia, MacCallum, IMGT, AНo или AbM или с помощью структурного анализа полиспецифической молекулы, где структурный анализ выявляет остатки в вариабельной(-ых) области(-ях), которые, согласно предположениям, вступают в контакт с эпитопной областью TIGIT.

[0089] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены антитела, которые специфически связываются с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) и содержат VH, содержащую аминокислотные

последовательности областей CDRH1, CDRH2 и CDRH3 VH, изложенные под SEQ ID NO: 7 или 8, и VL, содержащую аминокислотные последовательности областей CDRL1, CDRL2, и CDRL3 VL, изложенные под SEQ ID NO: 9 или 10, где каждая CDR определена независимо в соответствии с одной из схем нумерации по Kabat, Chothia, MacCallum, IMGT, АНo или AbM или с помощью структурного анализа полиспецифической молекулы, где структурный анализ выявляет остатки в варибельной(-ых) области(-ях), которые, согласно предположениям, вступают в контакт с эпитопной областью TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака).

[0090] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где выделенное антитело содержит VH, содержащую аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3, изложенные под SEQ ID NO: 1, 2 и 3 соответственно.

[0091] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где выделенное антитело содержит VL, содержащую аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3, изложенные под SEQ ID NO: 4, 5 и 6 соответственно.

[0092] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где выделенное антитело содержит VH, содержащую области CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и VL, содержащую области CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где области CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат аминокислотные последовательности, изложенные под SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 и 6 соответственно.

[0093] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), содержащее VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% (например, на по меньшей мере 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 7 или 8. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), содержащее VH, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 7 или 8. В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность VH состоит из аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 7 или 8.

[0094] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), содержащее VL, содержащую

аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% (например, на по меньшей мере 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 9 или 10. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), содержащее VL, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 9 или 10. В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность VL состоит из аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 9 или 10.

[0095] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), содержащее VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% (например, на по меньшей мере 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 7 или 9, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% (например, на по меньшей мере 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентична аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 9 или 10. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), содержащее VH, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7 или 8, и VL, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9 или 10. В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность VH состоит из аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 7 или 8; и аминокислотная последовательность VL состоит из аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 9 или 10.

[0096] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), содержащее аминокислотные последовательности VH и VL, изложенные под SEQ ID NO: 7 и 9; 7 и 10; 8 и 9 или 8 и 10 соответственно. В определенных вариантах осуществления аминокислотные последовательности VH и VL состоят из аминокислотных последовательностей, изложенных под SEQ ID NO: 7 и 9; 7 и 10; 8 и 9 или 8 и 10 соответственно.

[0097] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое перекрестно конкурирует за связывание с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) с антителом, содержащим аминокислотные последовательности VH и VL, изложенные под SEQ ID NO: 7 и 9; 7 и 10; 8 и 9 или 8 и 10 соответственно.

[0098] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении

предусмотрено выделенное антитело, которое связывается с таким же или перекрывающимся эпитопом TIGIT (например, эпитопом TIGIT человека или эпитопом TIGIT яванского макака), что и описанное в данном документе антитело, например, антитело, содержащее аминокислотные последовательности VH и VL, изложенные под SEQ ID NO: 7 и 9; 7 и 10; 8 и 9 или 8 и 10 соответственно.

[0099] В определенных вариантах осуществления эпитоп антитела можно определить, например, с помощью ЯМР-спектроскопии, поверхностного плазмонного резонанса (BIAcore[®]), рентген-дифракционных кристаллографических исследований, ELISA-анализов, водородно-дейтериевого обмена в сочетании с масс-спектрометрией (например, жидкостной хроматографией с электрораспылением и масс-спектрометрией), анализов сканирования олигопептидов на матричной основе и/или картирования с помощью мутагенеза (например, картирования с помощью сайт-направленного мутагенеза). В случае рентгеновской кристаллографии кристаллизацию можно осуществить с применением любого из способов, известных в данной области техники (например, Giegé R *et al.*, (1994) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50(Pt 4): 339-350; McPherson A (1990) *Eur J Biochem* 189: 1-23; Chayen NE (1997) *Structure* 5: 1269-1274; McPherson A (1976) *J Biol Chem* 251: 6300-6303, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Кристаллы антитело:антиген можно изучать с применением хорошо известных методик рентгеновской дифракции и можно уточнить с применением компьютерного программного обеспечения, такого как X-PLOR (Yale University, 1992, распространяемое Molecular Simulations, Inc.; см., например, *Meth Enzymol* (1985), volumes 114 & 115, eds. Wyckoff HW *et al.*; заявка на патент США № 2004/0014194) и BUSTER (Bricogne G (1993) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 49(Pt 1): 37-60; Bricogne G (1997) *Meth Enzymol* 276A: 361-423, ed. Carter CW; Roversi P *et al.*, (2000) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56(Pt 10): 1316-1323, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Исследования по картированию с помощью мутагенеза можно проводить с применением любого способа, известного специалисту в данной области техники. Описание методик мутагенеза, в том числе методик аланин-сканирующего мутагенеза, см., например, в Champe M *et al.*, (1995) выше и Cunningham BC & Wells JA (1989) выше. В конкретном варианте осуществления эпитоп антитела определяют с применением исследований методом аланин-сканирующего мутагенеза. Кроме того, антитела, которые распознают и связываются с такими же или перекрывающимися эпитопами TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), можно выявить с применением стандартных методик, таких как иммуноанализ, например, при проявлении способности одного антитела блокировать связывание другого антитела с целевым антигеном, т. е. анализ конкурентного связывания. Анализы конкурентного связывания также можно применять для определения того, обладают ли два антитела подобной специфичностью связывания в отношении эпитопа. Конкурентное связывание можно определить в анализе, в котором тестируемый иммуноглобулин ингибирует специфическое связывание эталонного

антитела с общим антигеном, таким как TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака). Известны многочисленные типы анализов конкурентного связывания, например: твердофазный прямой или непрямой радиоиммуноанализ (RIA), твердофазный прямой или непрямой иммуноферментный анализ (EIA), конкурентный сэндвич-анализ (см. Stahl C *et al.*, (1983) *Methods Enzymol* 9: 242-253); твердофазный прямой биотин-авидиновый EIA (см. Kirkland TN *et al.*, (1986) *J Immunol* 137: 3614-9); твердофазный анализ с прямым мечением, твердофазный сэндвич-анализ с прямым мечением (см. Harlow E & Lane D, (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press); твердофазный RIA с прямым мечением с помощью метки I-125 (см. Morel GA *et al.*, (1988) *Mol Immunol* 25(1): 7-15); твердофазный прямой биотин-авидиновый EIA (см. Cheung RC *et al.*, (1990) *Virology* 176: 546-52) и RIA с прямым мечением (см. Moldenhauer G *et al.*, (1990) *Scand J Immunol* 32: 77-82), все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Как правило, такой анализ предусматривает применение очищенного антигена (например, TIGIT, такого как TIGIT человека или TIGIT яванского макака), связанного с твердой поверхностью или клетками, несущими любой из них, немеченого тестируемого иммуноглобулина и меченого эталонного иммуноглобулина. Конкурентное ингибирование можно измерить путем определения количества метки, связанной с твердой поверхностью или клетками в присутствии тестируемого иммуноглобулина. Обычно тестируемый иммуноглобулин присутствует в избытке. Обычно, если конкурирующее антитело присутствует в избытке, оно будет ингибировать специфическое связывание эталонного антитела с общим антигеном на по меньшей мере 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75% или больше. Анализ конкурентного связывания может выполняться в большом количестве различных форматов с применением либо меченого антигена, либо меченого антитела. В обычной версии этого анализа антиген иммобилизуют на 96-луночном планшете. Способность немеченых антител блокировать связывание меченых антител с антигеном затем измеряют с применением радиоактивных или ферментных меток. Дополнительную информацию см., например, в Wagener C *et al.*, (1983) *J Immunol* 130: 2308-2315; Wagener C *et al.*, (1984) *J Immunol Methods* 68: 269-274; Kuroki M *et al.*, (1990) *Cancer Res* 50: 4872-4879; Kuroki M *et al.*, (1992) *Immunol Invest* 21: 523-538; Kuroki M *et al.*, (1992) *Hybridoma* 11: 391-407 и *Antibodies: A Laboratory Manual*, ed. Harlow E & Lane D editors *выше*, pp. 386-389, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00100] В определенных вариантах осуществления антитело ингибирует связывание TIGIT человека с CD155 человека (также известным как рецептор полиовируса (PVR)). В определенных вариантах осуществления связывание TIGIT человека с CD155 человека уменьшается на более чем 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% в присутствии антитела относительно связывания TIGIT человека с CD155 человека в отсутствие антитела.

[00101] В определенных вариантах осуществления антитело ингибирует

связывание растворимого фрагмента TIGIT человека с растворимым фрагментом CD155 человека. В определенных вариантах осуществления связывание растворимого фрагмента TIGIT человека с растворимым фрагментом CD155 человека уменьшается на более чем 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% в присутствии антитела относительно связывания растворимого фрагмента TIGIT человека с растворимым фрагментом CD155 человека в отсутствие антитела.

[00102] В определенных вариантах осуществления антитело ингибирует связывание TIGIT-экспрессирующей клетки с растворимым фрагментом CD155 человека. В определенных вариантах осуществления связывание TIGIT-экспрессирующей клетки с растворимым фрагментом CD155 человека уменьшается на более чем 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% в присутствии антитела относительно связывания клетки, экспрессирующей TIGIT, с растворимым фрагментом CD155 человека в отсутствие антитела.

[00103] В определенных вариантах осуществления антитело ингибирует связывание TIGIT-экспрессирующей клетки с клеткой, экспрессирующей CD155 человека. В определенных вариантах осуществления связывание TIGIT-экспрессирующей клетки с CD155-экспрессирующей клеткой уменьшается на более чем 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% в присутствии антитела относительно связывания TIGIT-экспрессирующей клетки с CD155-экспрессирующей клеткой в отсутствие антитела.

[00104] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 11, 12, 19 или 20. В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность тяжелой цепи состоит из аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 11, 12, 19 или 20.

[00105] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), при этом антитело содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 13, 14, 15 или 21. В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность легкой цепи состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13, 14, 15 или 21.

[00106] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая цепь и легкая цепь содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 11 и 13; 11 и 14; 11 и 15; 11 и 21; 12 и 13; 12 и 14; 12 и 15; 12 и 21; 19 и 13; 19 и 14; 19 и 15; 19 и 21; 20 и 13; 20 и 14; 20 и 15 или 20 и 21

соответственно.

[00107] В определенных вариантах осуществления аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи состоят из аминокислотных последовательностей, выбранных из групп, состоящих из SEQ ID NO: 11 и 13; 11 и 14; 11 и 15; 11 и 21; 12 и 13; 12 и 14; 12 и 15; 12 и 21; 19 и 13; 19 и 14; 19 и 15; 19 и 21; 20 и 13; 20 и 14; 20 и 15 или 20 и 21 соответственно.

[00108] В определенных вариантах осуществления раскрытое в данном документе антитело конъюгировано с цитотоксическим средством, цитостатическим средством, токсином, радионуклидом или детектируемой меткой. В определенных вариантах осуществления цитотоксическое средство способно индуцировать гибель или разрушение клетки при контакте с ним. В определенных вариантах осуществления цитостатическое средство способно предупреждать или существенно уменьшать пролиферацию и/или ингибировать активность или осуществление функции клетки при контакте с ним. В определенных вариантах осуществления цитотоксическое средство или цитостатическое средство представляет собой химиотерапевтическое средство. В определенных вариантах осуществления радионуклид выбран из группы, состоящей из изотопов ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{117}Lu , ^{121}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{198}Au , ^{211}At , ^{213}Bi , ^{225}Ac и ^{186}Re . В определенных вариантах осуществления детектируемая метка содержит флуоресцентную частицу или концевую группу для клик-химии.

[00109] В антителах, раскрытых в данном документе, можно применять любую константную область иммуноглобулина (Ig). В определенных вариантах осуществления область Ig относится к молекуле человеческого иммуноглобулина IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY, любому классу (например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂) или любому подклассу (например, IgG_{2a} и IgG_{2b}) молекулы иммуноглобулина.

[00110] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), при этом антитело содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16 или 22. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), при этом антитело содержит константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 17 или 18.

[00111] В определенных вариантах осуществления одна, две или более мутаций (например, аминокислотные замены) введены в Fc-область (например, домен CH2 (остатки 231-340 IgG₁ человека) и/или домен CH3 (остатки 341-447 IgG₁ человека), которые пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU) и/или шарнирную область (остатки 216-230, пронумерованные в соответствии с системой нумерации EU) описанного в данном документе антитела для изменения одного или более функциональных свойств антитела, таких как период полужизни в сыворотке крови,

фиксация комплемента, связывание с Fc-рецептором и/или антигензависимая клеточная цитотоксичность.

[00112] В определенных вариантах осуществления одна, две или более мутаций (например, аминокислотные замены) введены в шарнирную область описанного в данном документе антитела, так что число цистеиновых остатков в шарнирной области изменяется (например, увеличивается или уменьшается), как описано, например, в патенте США № 5677425, включенном в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Число цистеиновых остатков в шарнирной области может быть изменено, например, для облегчения сборки легкой и тяжелой цепей или для изменения (например, увеличения или уменьшения) стабильности антитела.

[00113] В конкретном варианте осуществления одна, две или более аминокислотных мутаций (например, замен, вставок или делеций) введены в константную область IgG или ее FcRn-связывающий фрагмент (предпочтительно Fc-фрагмент или шарнир-Fc-фрагмент) для изменения (например, уменьшения или увеличения) периода полужизни антитела в условиях *in vivo*. См., например, международные публикации №№ WO 02/060919; WO 98/23289 и WO 97/34631; а также патенты США №№ 5869046, 6121022, 6277375 и 6165745, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, например, мутации, которые будут изменять (например, увеличивать или уменьшать) период полужизни антитела в условиях *in vivo*. В определенных вариантах осуществления одна, две или более аминокислотных мутаций (например, замен, вставок или делеций) введены в константную область IgG или ее FcRn-связывающий фрагмент (предпочтительно Fc-фрагмент или шарнир-Fc-фрагмент) для уменьшения периода полужизни антитела в условиях *in vivo*. В других вариантах осуществления одна, две или более аминокислотных мутаций (например, замен, вставок или делеций) введены в константную область IgG или ее FcRn-связывающий фрагмент (предпочтительно Fc-фрагмент или шарнир-Fc-фрагмент) для увеличения периода полужизни антитела в условиях *in vivo*. В конкретном варианте осуществления антитела могут иметь одну или более аминокислотных мутаций (например, замен) во втором константном (CH2) домене (остатки 231-340 IgG₁ человека) и/или в третьем константном (CH3) домене (остатки 341-447 IgG₁ человека), которые пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU. В конкретном варианте осуществления константная область IgG₁ описанного в данном документе антитела содержит 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, которые пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU. См. патент США № 7658921, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Было показано, что такой тип мутантного IgG, называемый «мутантом YTE», демонстрирует четырехкратно увеличенный период полужизни по сравнению с версиями дикого типа того же антитела (см. Dall'Acqua WF *et al.*, (2006) J Biol Chem 281: 23514-24, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В определенных вариантах

осуществления антитело содержит константную область IgG, содержащую одну, две, три или более аминокислотных замен аминокислотных остатков в положениях 251-257, 285-290, 308-314, 385-389 и 428-436, которые пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU.

[00114] В определенных вариантах осуществления одна, две или более мутаций (например, аминокислотные замены) введены в Fc-область (например, домен CH2 (остатки 231-340 IgG₁ человека) и/или домен CH3 (остатки 341-447 IgG₁ человека), которые пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU) и/или шарнирную область (остатки 216-230, пронумерованные в соответствии с системой нумерации EU) описанного в данном документе антитела для увеличения или уменьшения аффинности антитела к Fc-рецептору (например, активированному Fc-рецептору) на поверхности эффекторной клетки. Мутации в Fc-области антитела, которые уменьшают или увеличивают аффинность антитела к Fc-рецептору, и методики введения таких мутаций в Fc-рецептор или его фрагмент известны специалисту в данной области техники. Примеры мутаций в Fc-рецепторе антитела, которые могут быть выполнены с целью изменения аффинности антитела к Fc-рецептору, описаны, например, в Smith P *et al.*, (2012) PNAS 109: 6181-6186; патенте США № 6737056 и международных публикациях №№ WO 02/060919; WO 98/23289 и WO 97/34631, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00115] В определенных вариантах осуществления антитело содержит константную область тяжелой цепи, которая является вариантом константной области тяжелой цепи дикого типа, где вариант константной области тяжелой цепи дикого типа связывается с FcγRIIB с большей аффинностью, чем константная область тяжелой цепи дикого типа связывается с FcγRIIB. В определенных вариантах осуществления вариант константной области тяжелой цепи является вариантом константной области человеческой тяжелой цепи, например, вариантом константной области тяжелой цепи человеческого IgG₁, IgG₂ или IgG₄. В определенных вариантах осуществления вариант константной области тяжелой цепи человеческого IgG содержит одну или более из следующих аминокислотных мутаций в соответствии с системой нумерации EU: G236D, P238D, S239D, S267E, L328F и L328E. В определенных вариантах осуществления вариант константной области тяжелой цепи человеческого IgG содержит набор аминокислотных мутаций, выбранных из группы, состоящей из: S267E и L328F; P238D и L328E; P238D и одна или более замен, выбранных из группы, состоящей из E233D, G237D, H268D, P271G и A330R; P238D, E233D, G237D, H268D, P271G и A330R; G236D и S267E; S239D и S267E; V262E, S267E и L328F; и V264E, S267E и L328F, в соответствии с системой нумерации EU. В определенных вариантах осуществления FcγRIIB экспрессируется на клетке, выбранной из группы, состоящей из макрофагов, моноцитов, В-клеток, дендритных клеток, эндотелиальных клеток и активированных Т-клеток.

[00116] В дополнительном варианте осуществления одна, две или более аминокислотных замен введены в Fc-область константной области IgG для изменения

эффекторной(-ых) функции(-ий) антитела. Например, одну или более аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 234, 235, 236, 237, 239, 243, 267, 292, 297, 300, 318, 320, 322, 328, 330, 332 и 396, которые пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU, можно заменить на отличающийся аминокислотный остаток, вследствие чего антитело характеризуется измененной аффинностью в отношении эффекторного лиганда, но сохраняет антигенсвязывающую способность исходного антитела. Эффекторный лиганд, аффинность к которому изменяют, может представлять собой, например, Fc-рецептор или компонент C1 системы комплемента. Такой подход более подробно описан в патентах США №№ 5624821 и 5648260, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В определенных вариантах осуществления делеция или инактивация (с помощью точечных мутаций или других средств) домена константной области может уменьшать связывание циркулирующего в кровотоке антитела с Fc-рецептором, тем самым повышая опухолевую локализацию. См., например, патенты США №№ 5585097 и 8591886, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, на предмет описания мутаций, которые удаляют или инактивируют константный домен и, тем самым, повышают опухолевую локализацию. В определенных вариантах осуществления одну или более аминокислотных замен можно ввести в Fc-область описанного в данном документе антитела для удаления потенциальных сайтов гликозилирования на Fc-области, что может снижать связывание с Fc-рецептором (см., например, Shields RL *et al.*, (2001) J Biol Chem 276: 6591-604, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В различных вариантах осуществления в константной области описанного в данном документе антитела можно создать одну или более из следующих мутаций: замену N297A; замену N297Q; замену L234A; замену L234F; замену L235A; замену L235F; замену L235V; замену L237A; замену S239D; замену E233P; замену L234V; замену L235A; делецию C236; замену P238A; замену S239D; замену F243L; замену D265A; замену S267E; замену L328F; замену R292P; замену Y300L; замену A327Q; замену P329A; замену A330L; замену I332E или замену P396L, которые пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU.

[00117] В определенных вариантах осуществления в константной области описанного в данном документе антитела можно создать мутацию, выбранную из группы, состоящей из D265A, P329A и их комбинации, которые пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU. В определенных вариантах осуществления в константной области описанного в данном документе антитела можно создать мутацию, выбранную из группы, состоящей из L235A, L237A и их комбинации, которые пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU. В определенных вариантах осуществления в константной области описанного в данном документе антитела можно создать мутацию, выбранную из группы, состоящей из S267E, L328F и их комбинации, которые пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU. В определенных вариантах осуществления в константной области описанного в данном документе антитела можно

создать мутацию, выбранную из группы, состоящей из S239D, I332E, необязательно A330L и их комбинации, которые пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU. В определенных вариантах осуществления в константной области описанного в данном документе антитела можно создать мутацию, выбранную из группы, состоящей из L235V, F243L, R292P, Y300L, P396L и их комбинации, которые пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU. В определенных вариантах осуществления в константной области описанного в данном документе антитела можно создать мутацию, выбранную из группы, состоящей из S267E, L328F и их комбинации, которые пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU.

[00118] В конкретном варианте осуществления описанное в данном документе антитело содержит константную область IgG₁ с аминокислотной заменой N297Q или N297A, пронумерованной в соответствии с системой нумерации EU. В определенных вариантах осуществления описанное в данном документе антитело содержит константную область IgG₁ с мутацией, выбранной из группы, состоящей из D265A, P329A и их комбинации, которые пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU. В другом варианте осуществления описанное в данном документе антитело содержит константную область IgG₁ с мутацией, выбранной из группы, состоящей из L234A, L235A и их комбинации, которые пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU. В другом варианте осуществления описанное в данном документе антитело содержит константную область IgG₁ с мутацией, выбранной из группы, состоящей из L234F, L235F, N297A и их комбинации, которые пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU. В определенных вариантах осуществления аминокислотные остатки в константной области описанного в данном документе антитела в положениях, соответствующих положениям L234, L235 и D265 в тяжелой цепи IgG₁ человека, которые пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU, не являются L, L и D соответственно. Такой подход подробно описан в международной публикации № WO 14/108483, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В определенных вариантах осуществления аминокислоты, соответствующие положениям L234, L235 и D265 в тяжелой цепи IgG₁ человека, представляют собой F, E и A; или A, A и A соответственно, которые пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU.

[00119] В определенных вариантах осуществления одну или более аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 329, 331 и 322 в константной области описанного в данном документе антитела, которые пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU, можно заменить на отличающийся аминокислотный остаток, вследствие чего антитело характеризуется измененным связыванием с C1q и/или сниженной или устраненной комплементзависимой цитотоксичностью (CDC). Такой подход более подробно описан в патенте США № 6194551 (Idusogie et al.), который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В определенных вариантах осуществления изменяют один или более аминокислотных остатков в пределах аминокислотных положений 231-238 в N-концевой области домена CH2 описанного в

данном документе антитела, которые пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU, тем самым изменяя способность антитела фиксировать систему комплемента. Такой подход дополнительно описан в международной публикации № WO 94/29351, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В определенных вариантах осуществления для повышения способности антитела опосредовать антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC) и/или повышения аффинности антитела к Fc γ -рецептору Fc-область описанного в данном документе антитела модифицируют путем осуществления мутации одной или более аминокислот (например, введением аминокислотных замен) в следующих положениях: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 или 439, которые пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU. Такой подход дополнительно описан в международной публикации № WO 00/42072, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00120] В определенных вариантах осуществления описанное в данном документе антитело содержит модифицированную константную область IgG₁, где модификация повышает способность антитела опосредовать антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC). В определенных вариантах осуществления 0,1, 1 или 10 мкг/мл антитела способны индуцировать клеточную гибель по меньшей мере 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55% или 60% TIGIT-экспрессирующих клеток в пределах 1, 2 или 3 часов, как измерено с помощью способов, которые описаны в данном документе и/или известны специалисту в данной области техники. В определенных вариантах осуществления модифицированная константная область IgG₁ содержит замены S239D и I332E, которые пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU. В определенных вариантах осуществления модифицированная константная область IgG₁ содержит замены S239D, A330L и I332E, которые пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU. В определенных вариантах осуществления модифицированная константная область IgG₁ содержит замены L235V, F243L, R292P, Y300L и P396L, которые пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU. В определенных вариантах осуществления антитело способно индуцировать клеточную гибель эффекторных T-клеток и Treg, где процентная доля Treg, которые подвергаются клеточной гибели, превышает процентную долю эффекторных T-клеток, которые подвергаются клеточной гибели, в по меньшей мере 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 1,6 раз, 1,7 раза, 1,8 раза, 1,9 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза или 5 раз.

[00121] В определенных вариантах осуществления описанное в данном документе антитело содержит константную область антитела IgG₄, а серин в аминокислотном остатке 228 тяжелой цепи, который пронумерован в соответствии с системой нумерации EU,

заменен на пролин. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), при этом антитело содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16 или 22.

[00122] В определенных вариантах осуществления любую из описанных в данном документе мутаций или модификаций константной области можно ввести в одну или обе константные области тяжелой цепи описанного в данном документе антитела, имеющего две константные области тяжелой цепи.

[00123] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) и выполняет функцию антагониста (например, уменьшает или ингибирует активность TIGIT).

[00124] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) и уменьшает или ингибирует активность TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) на по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%, как оценено с помощью способов, описанных в данном документе и/или известных специалисту в данной области техники, относительно активности TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) без какого-либо антитела или с неродственным антителом (например, антителом, которое специфически не связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)). В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) и уменьшает или ингибирует активность TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) в по меньшей мере приблизительно 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз, как оценено с помощью способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники, относительно активности TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) без какого-либо антитела или с неродственным антителом (например, антителом, которое специфически не связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)). Неограничивающие примеры активности TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) могут включать передачу сигналов TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака); связывание TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) с его лигандом ((например, CD155) или его фрагментом и/или слитым белком); активацию Т-клетки (например, Т-клетки, экспрессирующей TIGIT человека); активацию натурального киллера (NK-клетки); уменьшение или ингибирование

Treg; увеличение продуцирования цитокинов (например, IL-2); увеличение активности CD155 (например, CD155 человека). В конкретных вариантах осуществления увеличение активности TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) оценивают, как описано в примерах.

[00125] В конкретных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывает TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) и уменьшает или ингибирует связывание TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) с его лигандом ((например, CD155) или его фрагментом и/или слитым белком) на по меньшей мере приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%, как оценено с помощью способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники, относительно связывания TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) с данным лигандом без какого-либо антитела или с неродственным антителом (например, антителом, которое специфически не связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)). В конкретных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) и повышает связывание TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) с его лигандом (например, CD155 (например, CD155 человека или яванского макака)) или его фрагментом и/или слитым белком) в по меньшей мере приблизительно 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз, как оценено с помощью способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники, относительно связывания TIGIT (например, TIGIT человека) с данным лигандом без какого-либо антитела или с неродственным антителом (например, антителом, которое специфически не связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)).

[00126] В конкретных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) и активирует Т-клетку (например, Т-клетку, экспрессирующую TIGIT человека). В определенных вариантах осуществления Т-клетка является Т-клеткой памяти. В определенных вариантах осуществления Т-клетка является первичной CD3-экспрессирующей Т-клеткой. В определенных вариантах осуществления Т-клетка является TIGIT-экспрессирующей клеткой Jurkat. В определенных вариантах осуществления раскрытое в данном документе антитело повышает активность ядерного фактора активированных Т-клеток (NFAT) на по меньшей мере приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%, как оценено с помощью способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области

техники, относительно активности NFAT без какого-либо антитела или с неродственным антителом (например, антителом, которое специфически не связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)). В определенных вариантах осуществления раскрытое в данном документе антитело повышает активность NFAT в по меньшей мере приблизительно 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз или более, как оценено с помощью способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники, относительно активности NFAT без какого-либо антитела или с неродственным антителом (например, антителом, которое специфически не связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)). В определенных вариантах осуществления антитело повышает активность NFAT в присутствии лиганда TIGIT (например, CD155) или его фрагмента, и/или слитого белка, и/или клетки, экспрессирующей лиганд TIGIT (например, моноцита или дендритной клетки).

[00127] В конкретных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) и повышает продуцирование цитокинов (например, IL-2) на по меньшей мере приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%, как оценено с помощью способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники, относительно продуцирования цитокинов без какого-либо антитела или с неродственным антителом (например, антителом, которое специфически не связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)). В конкретных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) и повышает продуцирование цитокинов (например, IL-2) в по меньшей мере приблизительно 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз или больше, как оценено с помощью способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники, относительно продуцирования цитокинов без какого-либо антитела или с неродственным антителом (например, антителом, которое специфически не связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)). В определенных вариантах осуществления антитело повышает продуцирование цитокинов (например, IL-2) в присутствии лиганда TIGIT ((например, CD155) или его фрагмента и/или слитого белка) и/или клетки, экспрессирующей лиганд TIGIT (например, моноцита или дендритной клетки). В определенных вариантах осуществления антитело повышает продуцирование IL-2 относительно продуцирования IL-2 без какого-либо антитела или с неродственным антителом (например, антителом, которое специфически не связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)).

[00128] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) и которое либо отдельно, либо в комбинации с антителом к PD-1 (например, пембролизумабом или ниволумабом) повышает продуцирование IFN γ и/или IL-2 в мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC) человека в ответ на стимуляцию энтеротоксином А стафилококка (SEA) в по меньшей мере приблизительно 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз, как оценено с помощью способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники, относительно продуцирования IFN γ и/или IL-2 без какого-либо антитела или с неродственным антителом (например, антителом, которое специфически не связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)).

[00129] В определенных вариантах осуществления простимулированные энтеротоксином А стафилококка (SEA) мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) человека в присутствии описанного в данном документе антитела, которое специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), характеризуются увеличенным продуцированием IFN γ и/или IL-2 в по меньшей мере приблизительно 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз относительно продуцирования IFN γ и/или IL-2 из PBMC, только простимулированных SEA без какого-либо антитела или с неродственным антителом (например, антителом, которое специфически не связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)), как оценено с помощью способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники.

[00130] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) и повышает или стимулирует вторичный иммунный ответ с участием Т-клетки памяти. В определенных вариантах осуществления Т-клеткой памяти является CD8 эффекторная Т-клетка памяти. В определенных вариантах осуществления Т-клеткой памяти является CD4 эффекторная Т-клетка памяти. В определенных вариантах осуществления антитело повышает число пролиферирующих Т-клеток памяти при приведении Т-клеток памяти в контакт с их родственным(-ыми) антигеном(-ами) в по меньшей мере приблизительно 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз, как оценено с помощью способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники, относительно числа пролиферирующих Т-клеток памяти при приведении Т-клеток памяти в контакт с их родственным(-ыми) антигеном(-

ами) в отсутствие какого-либо антитела или в присутствии неродственного антитела (например, антитела, которое специфически не связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)). В определенных вариантах осуществления антитело повышает продуцирование цитокина (например, $IFN\gamma$, $TNF\alpha$) из Т-клетки памяти при приведении Т-клетки памяти в контакт с ее родственным антителом в по меньшей мере приблизительно 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз, как оценено с помощью способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники, относительно продуцирования цитокина из Т-клетки памяти при приведении Т-клетки памяти в контакт с ее родственным антителом в отсутствие какого-либо антитела или в присутствии неродственного антитела (например, антитела, которое специфически не связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)).

[00131] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) и активирует НК-клетку. В определенных вариантах осуществления НК-клетки являются выделенными. В определенных вариантах осуществления НК-клетки находятся в смешанной культуре РВМС. В определенных вариантах осуществления раскрытое в данном документе антитело повышает уровень экспрессии CD107a в НК-клетках на по меньшей мере приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%, как оценено с помощью способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники, относительно уровня экспрессии CD107a в НК-клетках без какого-либо антитела или с неродственным антителом (например, антителом, которое специфически не связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)). В определенных вариантах осуществления раскрытое в данном документе антитело повышает уровень экспрессии CD107a в НК-клетках в по меньшей мере приблизительно 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз или больше, как оценено с помощью способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники, относительно уровня экспрессии CD107a в НК-клетках без какого-либо антитела или с неродственным антителом (например, антителом, которое специфически не связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)). В определенных вариантах осуществления раскрытое в данном документе антитело повышает продуцирование цитокина (например, $IFN\gamma$ и/или $TNF\alpha$) из НК-клеток на по меньшей мере приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%, как оценено с помощью способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники, относительно продуцирования цитокина

(например, IFN γ и/или TNF α) из NK-клеток без какого-либо антитела или с неродственным антителом (например, антителом, которое специфически не связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)). В определенных вариантах осуществления раскрытое в данном документе антитело повышает продуцирование цитокина (например, IFN γ и/или TNF α) из NK-клеток в по меньшей мере приблизительно 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз или больше, как оценено с помощью способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники, относительно продуцирования цитокина (например, IFN γ и/или TNF α) из NK-клеток без какого-либо антитела или с неродственным антителом (например, антителом, которое специфически не связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)).

7.3 Фармацевтические композиции

[00132] В данном документе представлены композиции, содержащие раскрытое в данном документе выделенное антитело к TIGIT, характеризующееся требуемой степенью чистоты, в физиологически приемлемом носителе, вспомогательном веществе или стабилизаторе (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA). Приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях и включают буферы, такие как фосфатный, цитратный и буфер на основе других органических кислот; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония, хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехин; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (менее приблизительно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие средства, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; металлокомплексы (например, Zn-белковые комплексы) и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, PLURONIC™ или полиэтиленгликоль (PEG).

[00133] В конкретном варианте осуществления фармацевтические композиции содержат раскрытое в данном документе выделенное антитело к TIGIT и необязательно одно или более дополнительных профилактических или терапевтических средств в фармацевтически приемлемом носителе. В конкретном варианте осуществления фармацевтические композиции содержат выделенное антитело к TIGIT и необязательно одно или более дополнительных профилактических или терапевтических средств в

фармацевтически приемлемом носителе. В определенных вариантах осуществления антители являются единственным активным ингредиентом, включенным в фармацевтическую композицию. Описанные в данном документе фармацевтические композиции могут быть применимы для увеличения или стимуляции активности TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) и лечения такого состояния, как рак или инфекционное заболевание. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции по настоящему изобретению, содержащей выделенное антители к TIGIT по настоящему изобретению, для применения в качестве лекарственного препарата. В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции по настоящему изобретению для применения в способе лечения рака или инфекционного заболевания.

[00134] Фармацевтически приемлемые носители, применяемые в препаратах для парентерального применения, включают водные среды-носители, неводные среды-носители, противомикробные средства, изотонические средства, буферы, антиоксиданты, местные анестетики, суспендирующие и диспергирующие средства, эмульгирующие средства, комплексообразующие или хелатообразующие средства и другие фармацевтически приемлемые вещества. Примеры водных сред-носителей включают раствор хлорида натрия для инъекций, раствор Рингера для инъекций, изотонический раствор декстрозы для инъекций, стерильную воду для инъекций, растворы Рингера для инъекций с добавлением декстрозы и лактата. Неводные среды-носители для парентерального применения включают нелетучие масла растительного происхождения, хлопковое масло, кукурузное масло, кунжутное масло и арахисовое масло. К лекарственным препаратам для парентерального применения, упакованным в многодозовые контейнеры, можно добавить противомикробные средства в бактериостатических или фунгистатических концентрациях, которые включают фенолы или крезолы, ртутьсодержащие вещества, бензиловый спирт, хлоробутанол, метиловые и пропиловые сложные эфиры п-гидроксibenзойной кислоты, тимеросал, хлорид бензалкония и хлорид бензетония. Изотонические средства включают хлорид натрия и декстрозу. Буферы включают фосфатный и цитратный. Антиоксиданты включают бисульфат натрия. Местные анестетики включают прокаин-гидрохлорид. Суспендирующие и диспергирующие средства включают натрий-карбоксиметилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу и поливинилпирролидон. Эмульгирующие средства включают полисорбат 80 (TWEEN[®] 80). Комплексообразующее или хелатирующее ионы металлов средство включает EDTA. Фармацевтические носители также включают этиловый спирт, полиэтиленгликоль и пропиленгликоль для водорастворимых сред-носителей и гидроксид натрия, хлористоводородную кислоту, лимонную кислоту или молочную кислоту для регулирования pH.

[00135] Фармацевтическую композицию можно составить для любого пути введения субъекту. Конкретные примеры путей введения включают интраназальный, пероральный, легочный, трансдермальный, интрадермальный и парентеральный. Также в

данном документе подразумевается парентеральное введение, характеризующееся одной из подкожной, внутримышечной или внутривенной инъекции. Инъекционные препараты могут быть приготовлены в традиционных формах, либо в виде водных растворов или суспензий, либо в виде твердых форм, пригодных для растворения или суспендирования в жидкости перед инъекцией, либо в виде эмульсий. Инъекционные препараты, растворы и эмульсии также содержат одно или более вспомогательных веществ. Подходящими вспомогательными веществами являются, например, вода, солевой раствор, декстроза, глицерин или этанол. Кроме того, в случае необходимости подлежащие введению фармацевтические композиции также могут содержать незначительные количества нетоксичных вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие средства, буферизирующие средства для регулирования pH, стабилизирующие вещества, усилители растворимости и другие подобные средства, такие как, например, ацетат натрия, сорбитанмонолаурат, триэтаноламинолеат и циклодекстрины.

[00136] Препараты для парентерального введения антитела включают готовые для инъекций стерильные растворы, стерильные сухие растворимые продукты, такие как лиофилизированные порошки, готовые к смешиванию с растворителем непосредственно перед применением, в том числе таблетки для подкожных инъекций, готовые для инъекции стерильные суспензии, стерильные сухие нерастворимые продукты, готовые к смешиванию со средой-носителем непосредственно перед применением, и стерильные эмульсии. Растворы могут быть либо водными, либо неводными.

[00137] При внутривенном введении подходящие носители включают физиологический раствор или фосфатно-солевой буферный раствор (PBS) и растворы, содержащие загущающие и солюбилизирующие средства, такие как глюкоза, полиэтиленгликоль и полипропиленгликоль, а также их смеси.

[00138] Смеси для местного применения, содержащие антитела, получают так, как описано для местного и системного введения. Полученная смесь может представлять собой раствор, суспензию, эмульсию и т. п. и может быть составлена в виде кремов, гелей, мазей, эмульсий, растворов, крепких настоев, лосьонов, суспензий, настоек, паст, пен, аэрозолей, препаратов для орошения, спреев, суппозиториев, повязок, кожных пластырей или любых других составов, подходящих для местного применения.

[00139] Раскрытое в данном документе выделенное антитело к TIGIT может быть составлено в виде аэрозоля для местного применения, например, путем ингаляции (см., например, патенты США №№ 4044126, 4414209 и 4364923, в которых описаны аэрозоли для доставки стероида, применимые для лечения воспалительных заболеваний, в частности астмы, и которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Данные составы для введения в дыхательные пути могут быть представлены в форме аэрозоля или раствора для небулайзера или в виде мелкодисперсного порошка для инсуффляции, отдельно или в комбинации с инертным носителем, таким как лактоза. В таком случае частицы состава в определенных вариантах осуществления будут иметь диаметр менее 50 микрон, в определенных вариантах

осуществления менее 10 микрон.

[00140] Раскрытое в данном документе выделенное антитело к TIGIT может быть составлено для локального или местного применения, например, для местного применения на коже и слизистых оболочках, таких как в глазу, в форме гелей, кремов и лосьонов и для нанесения на глаз, или для интрацистернального или интраспинального применения. Предусмотрено местное применение для чрескожной доставки, а также для введения в глаза или на слизистую оболочку или для вариантов ингаляционной терапии. Также назальные растворы антитела можно вводить отдельно или в комбинации с другими фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами.

[00141] Трансдермальные пластыри, в том числе устройства для ионофореза и электрофореза, хорошо известны специалистам в данной области техники, и их можно применять для введения антитела. Например, такие пластыри раскрыты в патентах США №№ 6267983, 6261595, 6256533, 6167301, 6024975, 6010715, 5985317, 5983134, 5948433 и 5860957, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00142] В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция, содержащая описанное в данном документе антитело, представляет собой лиофилизированный порошок, который можно восстановить для введения в виде растворов, эмульсий и других смесей. Он также может быть восстановлен и составлен в виде твердых веществ или гелей. Лيوфилизированный порошок получают путем растворения описанного в данном документе антитела или его фармацевтически приемлемого производного в подходящем растворителе. В определенных вариантах осуществления лиофилизированный порошок является стерильным. Растворитель может содержать вспомогательное вещество, которое повышает стабильность другого фармакологического компонента порошка или восстановленного раствора, полученного из порошка. Вспомогательные вещества, которые можно применять, включают без ограничения декстрозу, сорбит, фруктозу, кукурузную патоку, ксилит, глицерин, глюкозу, сахарозу или другое подходящее средство. Растворитель также может содержать буфер, такой как цитрат, фосфат натрия или калия, или другой подобный буфер, известный специалистам в данной области техники, в определенных вариантах осуществления с приблизительно нейтральным pH. Последующая стерилизующая фильтрация раствора, за которой следует лиофилизация в стандартных условиях, известных специалистам в данной области техники, обеспечивают требуемый состав. В определенных вариантах осуществления полученный раствор будут распределять по флаконам для лиофилизации. Каждый флакон будет содержать одну дозу или несколько доз соединения. Лيوфилизированный порошок можно хранить в соответствующих условиях, например, при температуре от приблизительно 4°C до комнатной температуры. Восстановления такого лиофилизованного порошка водой для инъекций обеспечивает состав для применения при парентеральном введении. Для восстановления лиофилизированный порошок добавляют в стерильную воду или другой подходящий носитель. Точное

количество зависит от выбранного соединения. Такое количество можно определить опытным путем.

[00143] Раскрытые в данном документе выделенные антитела к TIGIT и другие представленные в данном документе композиции также могут быть составлены для целенаправленного воздействия на конкретную ткань, рецептор или другую область тела субъекта, подлежащего лечению. Многие такие способы нацеливания хорошо известны специалистам в данной области техники. Все такие способы нацеливания предусмотрены в данном документе для применения в композициях по настоящему изобретению. Неограничивающие примеры способов нацеливания см., например, в патентах США №№ 6316652, 6274552, 6271359, 6253872, 6139865, 6131570, 6120751, 6071495, 6060082, 6048736, 6039975, 6004534, 5985307, 5972366, 5900252, 5840674, 5759542 и 5709874, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В конкретном варианте осуществления описанное в данном документе антитело нацелено на опухоль.

[00144] Композиции, предназначенные для введения *in vivo*, могут быть стерильными. Это легко достигается путем фильтрации, например, через мембраны для стерилизующей фильтрации.

7.4 Способы применения и варианты применения

[00145] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения субъекта с применением раскрытых в данном документе антител к TIGIT. С применением раскрытых в данном документе выделенных антител к TIGIT можно лечить любое заболевание или нарушение у субъекта, который будет получать пользу от уменьшения функции TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака). В определенных вариантах осуществления заболевание или нарушение является невосприимчивым к средству, нацеливаемому на контрольную точку иммунного ответа (например, антагонистическому антителу к CTLA-4, антагонистическому антителу к PD-L1, антагонистическому антителу к PD-L2 или антагонистическому антителу к PD-1). В определенных вариантах осуществления заболевание или нарушение рецидивирует после лечения средством, нацеливающимся на контрольную точку иммунного ответа (например, антагонистическим антителом к CTLA-4, антагонистическим антителом к PD-L1, антагонистическим антителом к PD-L2 или антагонистическим антителом к PD-1).

[00146] Раскрытые в данном документе выделенные антитела к TIGIT особенно пригодны для ингибирования толерантности иммунной системы к опухолям, и, соответственно, их можно применять в качестве средства иммунотерапии для субъектов, имеющих рак. Например, в определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ увеличения активации Т-клеток (например, цитотоксических CD8⁺ Т-клеток, хелперных CD4⁺ Т-клеток, НКТ-клеток, эффекторных Т-клеток или Т-клеток памяти) в ответ на антиген у субъекта, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества выделенного антитела к TIGIT или фармацевтической композиции на его основе, раскрытых в данном документе. В

определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения рака у субъекта, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества антитела или фармацевтической композиции, раскрытых в данном документе.

[00147] Формы рака, которые можно лечить с помощью раскрытых в данном документе выделенных антител к TIGIT или фармацевтических композиций, включают без ограничения солидную опухоль, гематологический рак (например, лейкоз, лимфому, миелому, например, множественную миелому) и метастатическое поражение. В определенных вариантах осуществления рак является солидной опухолью. Примеры солидных опухолей включают злокачественные новообразования, например, саркомы и карциномы, например, аденокарциномы различных систем органов, таких как поражающие легкое, молочную железу, яичник, лимфоузел, желудочно-кишечный тракт (например, толстую кишку), анальный канал, гениталии и мочеполовой тракт (например, клетки почки, уротелия, мочевого пузыря, предстательную железу), глотку, ЦНС (например, головной мозг, нервные или глиальные клетки), голову и шею, кожу (например, меланома) и поджелудочную железу, а также аденокарциномы, которые включают злокачественные новообразования, такие как формы рака толстой кишки, рак прямой кишки, почечно-клеточную карциному, рак печени, рак легкого (например, немелкоклеточный рак легкого или мелкоклеточный рак легкого), рак тонкого кишечника и рак пищевода. Рак может находиться на ранней, средней, поздней стадии или представлять собой метастатический рак. В определенных вариантах осуществления рак является невосприимчивым к средству, нацеливаемому на контрольную точку иммунного ответа (например, антагонистическому антителу к CTLA-4, антагонистическому антителу к PD-L1, антагонистическому антителу к PD-L2 или антагонистическому антителу к PD-1). В определенных вариантах осуществления рак рецидивирует после лечения средством, нацеливающимся на контрольную точку иммунного ответа (например, антагонистическим антителом к CTLA-4, антагонистическим антителом к PD-L1, антагонистическим антителом к PD-L2 или антагонистическим антителом к PD-1).

[00148] В определенных вариантах осуществления рак выбран из рака легкого (например, аденокарциномы легкого или немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) (например, NSCLC с плоскоклеточной и/или не плоскоклеточной гистологией, или NSCLC-аденокарциномы)), меланомы (например, меланомы на поздних стадиях), рака почки (например, почечно-клеточной карциномы), рака печени (например, гепатоцеллюлярной карциномы), миеломы (например, множественной миеломы), рака предстательной железы, рака молочной железы (например, рака молочной железы, при котором не экспрессируется один, два или все из эстрогенового рецептора, прогестеронового рецептора или Her2/neu, например, трижды отрицательного рака молочной железы), рака яичника, колоректального рака, рака поджелудочной железы, рака головы и шеи (например, плоскоклеточной карциномы головы и шеи (HNSCC)), рака анального канала, рака желудка и пищевода (например, плоскоклеточной карциномы

пищевода), мезотелиомы, рака носоглотки, рака щитовидной железы, рака шейки матки, эпителиального рака, перитонеального рака или лимфопролиферативного заболевания (например, посттрансплантационного лимфопролиферативного заболевания). В конкретном варианте осуществления рак является раком шейки матки.

[00149] В определенных вариантах осуществления рак является гематологическим раком, например, лейкозом, лимфомой или миеломой. В определенных вариантах осуществления рак представляет собой лейкоз, например, острый лимфобластный лейкоз (ALL), острый миелогенный лейкоз (AML), острый миелобластный лейкоз (AML), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), хронический миелогенный лейкоз (CML), хронический миелоидный лейкоз (CML), хронический миеломоноцитарный лейкоз (CMML), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL) или волосатоклеточный лейкоз. В определенных вариантах осуществления рак представляет собой лимфому, например, В-клеточную лимфому, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL), диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому с активированными В-клетками (ABC), диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому из В-клеток зародышевого центра (GCB), лимфому из клеток мантийной зоны, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, рецидивирующую неходжкинскую лимфому, рефрактерную неходжкинскую лимфому, рецидивирующую фолликулярную неходжкинскую лимфому, лимфому Беркитта, малую лимфоцитарную лимфому, фолликулярную лимфому, лимфоплазмоцитарную лимфому или экстранодальную лимфому из клеток маргинальной зоны. В определенных вариантах осуществления рак является миеломой, например, множественной миеломой.

[00150] В другом варианте осуществления рак выбран из карциномы (например, карциномы на поздних стадиях или метастатической карциномы), меланомы или карциномы легкого, например, немелкоклеточной карциномы легкого.

[00151] В определенных вариантах осуществления рак представляет собой рак легкого, например, аденокарциному легкого, немелкоклеточный рак легкого или мелкоклеточный рак легкого.

[00152] В определенных вариантах осуществления рак является меланомой, например, меланомой на поздних стадиях. В определенных вариантах осуществления рак является меланомой на поздних стадиях или неоперабельной меланомой, которая не отвечает на другие виды терапии. В других вариантах осуществления рак является меланомой с мутацией BRAF (например, мутацией BRAF V600). В других вариантах осуществления раскрытые в данном документе выделенные антитела к TIGIT или фармацевтическую композицию вводят после лечения антителом к CTLA-4 (например, ипилимумабом) с ингибитором BRAF (например, вемурафенибом или дабрафенибом) или без него.

[00153] В другом варианте осуществления рак представляет собой гепатокарциному, например, гепатокарциному на поздних стадиях, с вирусной инфекцией или без нее, например, хроническим вирусным гепатитом.

[00154] В другом варианте осуществления рак является раком предстательной железы, например, раком предстательной железы на поздних стадиях.

[00155] В еще одном варианте осуществления рак является миеломой, например, множественной миеломой.

[00156] В еще одном варианте осуществления рак представляет собой рак почки, например, почечно-клеточную карциному (RCC) (например, метастатическую RCC, светлоклеточный рак почки (CCRCC) или папиллярную почечно-клеточную карциному).

[00157] В еще одном варианте осуществления рак выбран из рака легкого, меланомы, рака почки, рака молочной железы, колоректального рака, лейкоза или метастатического поражения при раке.

[00158] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ предупреждения или лечения инфекционного заболевания у субъекта, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества выделенного антитела к TIGIT или фармацевтической композиции на его основе, раскрытых в данном документе. В определенных вариантах осуществления в данном документе предусмотрены способы предупреждения и/или лечения инфекции (например, вирусной инфекции, бактериальной инфекции, грибковой инфекции, протозойной инфекции или паразитарной инфекции). Инфекция, которую предупреждают и/или лечат в соответствии со способами, может быть вызвана возбудителем инфекции, указанным в данном документе. В конкретном варианте осуществления описанное в данном документе выделенное антитело к TIGIT или композиция на его основе представляют собой единственное активное средство, вводимое субъекту. В определенных вариантах осуществления описанное в данном документе выделенное антитело к TIGIT или композицию на его основе применяют в комбинации с противoinфекционными мерами (например, противовирусными, антибактериальными, противогрибковыми или антигельминтными средствами) для лечения инфекционных заболеваний. Таким образом, в одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к антителу и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для применения в способе предупреждения и/или лечения инфекционного заболевания, где необязательно антитело или фармацевтическая композиция представляют собой единственное активное средство, вводимое субъекту, или где антитело или фармацевтическую композицию применяют в комбинации с противoinфекционными мерами.

[00159] Инфекционные заболевания, которые можно лечить и/или предупреждать с помощью раскрытых в данном документе выделенных антител к TIGIT или фармацевтических композиций, вызывают возбудители инфекций, в том числе без ограничения бактерии, паразиты, грибки, простейшие и вирусы. В конкретном варианте осуществления инфекционное заболевание, которое лечат и/или предупреждают с помощью раскрытых в данном документе выделенных антител к TIGIT или фармацевтических композиций, вызывает вирус. Вирусные заболевания или вирусные инфекции, которые можно предупреждать и/или лечить в соответствии с описанными в

данном документе способами, включают без ограничения вызванные вирусами гепатита типа А, гепатита типа В, гепатита типа С, гриппа (например, гриппа А или гриппа В), ветряной оспы, аденовирусом, вирусами простого герпеса типа I (HSV-I), простого герпеса типа II (HSV-II), возбудителем чумы крупного рогатого скота, риновирусом, эховирусом, ротавирусом, респираторно-синцитиальным вирусом, вирусом папилломы, паповавирусом, цитомегаловирусом, эхиновирусом, арбовирусом, хантавирусом, вирусом Коксаки, вирусом эпидемического паротита, вирусом кори, вирусом краснухи, вирусом полиомиелита, возбудителем натуральной оспы, вирусом Эпштейна-Барр, вирусом иммунодефицита человека типа I (HIV-I), вирусом иммунодефицита человека типа II (HIV-II) и возбудителями таких вирусных заболеваний, как вирусный менингит, энцефалит, лихорадка денге или натуральная оспа.

[00160] Бактериальные инфекции, которые можно предупредить и/или лечить, включают инфекции, вызванные *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus viridans* и *Pseudomonas aeruginosa*. Бактериальные заболевания, вызванные бактериями (например, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus viridans* и *Pseudomonas aeruginosa*), которые можно предупредить и/или лечить в соответствии с описанными в данном документе способами, включают без ограничения заболевания, вызванные *Mycobacteria rickettsia*, *Mycoplasma*, *Neisseria*, *S. pneumonia*, *Borrelia burgdorferi* (болезнь Лайма), *Bacillus anthracis* (сибирская язва), возбудителем столбняка, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, микобактериями, бактерией Борде-Жангу, холерным вибрионом, возбудителем чумы, дифтерии, хламидиями, *S. aureus* и легионеллой.

[00161] Вызванные простейшими протозойные заболевания или протозойные инфекции, которые можно предупредить и/или лечить в соответствии с описанными в данном документе способами, включают без ограничения лейшманиоз, кокцидиоз, трипаносомоз, шистосомоз или малярию. Вызванные паразитами паразитарные заболевания или паразитарные инфекции, которые можно предупредить и/или лечить в соответствии со способами, описанными в данном документе, включают без ограничения заболевания, вызванные хламидиями и риккетсиями.

[00162] Грибковые заболевания или грибковые инфекции, которые можно предупредить и/или лечить в соответствии с описанными в данном документе способами, включают без ограничения инфекции, вызванные *Candida*, зигомикозы, кандидозные маститы, прогрессирующий диссеминированный трихоспороноз с латентной трихоспорономией, диссеминированный кандидоз, легочный паракокцидиоидомикоз, легочный аспергиллез, пневмонию, вызванную *Pneumocystis carinii*, криптококковый менингит, кокцидиоидный менингоэнцефалит и цереброспинальный васкулит, инфекцию, вызванную *Aspergillus niger*, фузариозный кератит, микозы околоносовых пазух, эндокардит, вызванный *Aspergillus fumigatus*, дисхондроплазию большеберцовой кости, вагинит, вызванный *Candida glabrata*, орофарингеальный кандидоз, X-сцепленную

хроническую гранулематозную болезнь, микоз стоп, кандидоз кожи, микотический плацентит, диссеминированный трихоспороноз, аллергический бронхолегочный аспергиллез, микотический кератит, инфекцию, вызванную *Cryptococcus neoformans*, грибковый перитонит, инфекцию, вызванную *Curvularia geniculata*, стафилококковый эндофтальмит, споротрихоз и дерматофитоз.

[00163] В определенных вариантах осуществления данные способы дополнительно включают введение субъекту дополнительного терапевтического средства. В определенных вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство представляет собой химиотерапевтическое, радиотерапевтическое или средство, нацеливающееся на контрольную точку иммунного ответа. В определенных вариантах осуществления химиотерапевтическим средством является гипометилирующее средство (например, азацитидин). В определенных вариантах осуществления химиотерапевтическим средством является индуцирующее повреждение ДНК средство (например, гемцитабин). В определенных вариантах осуществления средство, нацеливающееся на контрольную точку иммунного ответа, выбрано из группы, состоящей из антагонистического антитела к CTLA-4, антагонистического антитела к PD-L1, антагонистического антитела к PD-L2, антагонистического антитела к PD-1, антагонистического антитела к TIM-3, антагонистического антитела к LAG-3, антагонистического антитела к VISTA, антагонистического антитела к CD96, антагонистического антитела к CEACAM1, агонистического антитела к CD137, агонистического антитела к GITR и агонистического антитела к OX40. В определенных вариантах осуществления средство, нацеливающееся на контрольную точку иммунного ответа, выбрано из группы, состоящей из антагонистического антитела к CTLA-4, антагонистического антитела к PD-L1, антагонистического антитела к PD-L2 и антагонистического антитела к PD-1, где раскрытые в данном документе антитела к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) или фармацевтические композиции обеспечивают синергический эффект со средством, нацеливающимся на контрольную точку иммунного ответа.

[00164] В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителу и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для применения в способе по настоящему изобретению, где способ дополнительно включает введение субъекту дополнительного терапевтического средства. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к (a) антителу и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению и (b) дополнительному терапевтическому средству для применения в качестве лекарственного препарата. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к (a) антителу и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению и (b) дополнительному терапевтическому средству для применения в способе лечения рака. В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, набору или комплексу компонентов, содержащему (a) антитело и/или

фармацевтическую композицию по настоящему изобретению и (b) дополнительное терапевтическое средство. В определенных вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство представляет собой химиотерапевтическое, радиотерапевтическое или средство, нацеливающееся на контрольную точку иммунного ответа.

[00165] В определенных вариантах осуществления в раскрытых в данном документе способах применяют антитело к PD-1. В определенных вариантах осуществления антителом к PD-1 является ниволумаб, также известный как BMS-936558 или MDX1106, разработанный Bristol-Myers Squibb. В определенных вариантах осуществления антителом к PD-1 является пембролизумаб, также известный как ламбролизумаб или МК-3475, разработанный Merck & Co. В определенных вариантах осуществления антителом к PD-1 является пидилизумаб, также известный как СТ-011, разработанный CureTech. В определенных вариантах осуществления антителом к PD-1 является MEDI0680, также известное как AMP-514, разработанное MedImmune. В определенных вариантах осуществления антителом к PD-1 является PDR001, разработанное Novartis Pharmaceuticals. В определенных вариантах осуществления антителом к PD-1 является REGN2810, разработанное Regeneron Pharmaceuticals. В определенных вариантах осуществления антителом к PD-1 является PF-06801591, разработанное Pfizer. В определенных вариантах осуществления антителом к PD-1 является BGB-A317, разработанное BeiGene. В определенных вариантах осуществления антителом к PD-1 является TSR-042, разработанное AnaptysBio и Tesaro. В определенных вариантах осуществления антителом к PD-1 является SHR-1210, разработанное Hengrui.

[00166] Дополнительные неограничивающие примеры антител к PD-1, которые можно применять в раскрытых в данном документе способах лечения, раскрыты в следующих патентах и патентных заявках, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей: патент США № 6808710; патент США № 7332582; патент США № 7488802; патент США № 8008449; патент США № 8114845; патент США № 8168757; патент США № 8354509; патент США № 8686119; патент США № 8735553; патент США № 8747847; патент США № 8779105; патент США № 8927697; патент США № 8993731; патент США № 9102727; патент США № 9205148; публикация заявки на патент США № US 2013/0202623 A1; публикация заявки на патент США № US 2013/0291136 A1; публикация заявки на патент США № US 2014/0044738 A1; публикация заявки на патент США № US 2014/0356363 A1; публикация заявки на патент США № US 2016/0075783 A1 и публикация согласно PCT № WO 2013/033091 A1; публикация согласно PCT № WO 2015/036394 A1; публикация согласно PCT № WO 2014/179664 A2; публикация согласно PCT № WO 2014/209804 A1; публикация согласно PCT № WO 2014/206107 A1; публикация согласно PCT № WO 2015/058573 A1; публикация согласно PCT № WO 2015/085847 A1; публикация согласно PCT № WO 2015/200119 A1; публикация согласно PCT № WO 2016/015685 A1 и публикация согласно PCT № WO 2016/020856 A1.

[00167] В определенных вариантах осуществления в раскрытых в данном документе способах применяют антитело к PD-L1. В определенных вариантах осуществления антителом к PD-L1 является атезолизумаб, разработанный Genentech. В определенных вариантах осуществления антителом к PD-L1 является дурвалумаб, разработанный AstraZeneca, Celgene и MedImmune. В определенных вариантах осуществления антителом к PD-L1 является авелумаб, также известный как MSB0010718C, разработанный Merck Serono и Pfizer. В определенных вариантах осуществления антителом к PD-L1 является MDX-1105, разработанное Bristol-Myers Squibb. В определенных вариантах осуществления антителом к PD-L1 является AMP-224, разработанное Amplimmune и GSK.

[00168] Неограничивающие примеры антител к PD-L1, которые можно применять при лечении раскрытыми в данном документе способами, раскрыты в следующих патентах и патентных заявках, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей: патент США № 7943743; патент США № 8168179; патент США № 8217149; патент США № 8552154; патент США № 8779108; патент США № 8981063; патент США № 9175082; публикация заявки на патент США № US 2010/0203056 A1; публикация заявки на патент США № US 2003/0232323 A1; публикация заявки на патент США № US 2013/0323249 A1; публикация заявки на патент США № US 2014/0341917 A1; публикация заявки на патент США № US 2014/0044738 A1; публикация заявки на патент США № US 2015/0203580 A1; публикация заявки на патент США № US 2015/0225483 A1; публикация заявки на патент США № US 2015/0346208 A1; публикация заявки на патент США № US 2015/0355184 A1 и публикация согласно PCT № WO 2014/100079 A1; публикация согласно PCT № WO 2014/022758 A1; публикация согласно PCT № WO 2014/055897 A2; публикация согласно PCT № WO 2015/061668 A1; публикация согласно PCT № WO 2015/109124 A1; публикация согласно PCT № WO 2015/195163 A1; публикация согласно PCT № WO 2016/000619 A1; и публикация согласно PCT № 2016/030350 A1.

[00169] В определенных вариантах осуществления в раскрытых в данном документе способах применяют антитело к CTLA-4. В определенных вариантах осуществления антителом к CTLA-4 является ипилимумаб, разработанный Bristol-Myers Squibb.

[00170] В определенных вариантах осуществления раскрытое в данном документе выделенное антитело к TIGIT вводят субъекту в комбинации с соединением, которое нацелено на иммуномодулирующий(-ие) фермент(-ы), такой(-ие) как IDO (индолеамин-(2,3)-диоксигеназа) и/или TDO (триптофан-2,3-диоксигеназа). Таким образом, в определенных вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство представляет собой соединение, которое нацелено на иммуномодулирующий(-ие) фермент(-ы), такой(-ие) как ингибитор индолеамин-(2,3)-диоксигеназы (IDO). В определенных вариантах осуществления такое соединение выбрано из группы, состоящей из эпикадостата (Incyte Corp; см., например, WO 2010/005958, которая включена в данный

документ посредством ссылки во всей своей полноте), F001287 (Flexus Biosciences/Bristol-Myers Squibb), индоксимода (NewLink Genetics) и NLG919 (NewLink Genetics). В определенных вариантах осуществления соединением является эпикадостат. В другом варианте осуществления соединением является F001287. В другом варианте осуществления соединением является индоксимод. В другом варианте осуществления соединением является NLG919. В конкретном варианте осуществления раскрытое в данном документе выделенное антитело к TIGIT вводят субъекту в комбинации с ингибитором IDO для лечения рака. Описанный в данном документе ингибитор IDO для применения в лечении рака представлен в такой твердой лекарственной форме фармацевтической композиции, как таблетка, пилюля или капсула, где фармацевтическая композиция включает ингибитор IDO и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. Таким образом, описанное в данном документе антитело и описанный в данном документе ингибитор IDO можно вводить отдельно, последовательно или одновременно в виде отдельных лекарственных форм. В определенных вариантах осуществления антитело вводят парентерально, а ингибитор IDO вводят перорально. В определенных вариантах осуществления ингибитор выбран из группы, состоящей из эпикадостата (Incyte Corporation), F001287 (Flexus Biosciences/Bristol-Myers Squibb), индоксимода (NewLink Genetics) и NLG919 (NewLink Genetics). Эпикадостат был описан в публикации согласно РСТ № WO 2010/005958, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей. В определенных вариантах осуществления ингибитором является эпикадостат. В другом варианте осуществления ингибитором является F001287. В другом варианте осуществления ингибитором является индоксимод. В другом варианте осуществления ингибитором является NLG919.

[00171] В определенных вариантах осуществления раскрытое в данном документе выделенное антитело к TIGIT вводят субъекту в комбинации с вакциной. Вакцина может представлять собой, например, пептидную вакцину, ДНК-вакцину или РНК-вакцину. В определенных вариантах осуществления вакцина представляет собой противоопухолевую вакцину на основе белка теплового шока или противопатогенную вакцину на основе белка теплового шока. В конкретном варианте осуществления раскрытое в данном документе выделенное антитело к TIGIT вводят субъекту в комбинации с противоопухолевой вакциной на основе белка теплового шока. Белки теплового шока (HSP) представляют собой семейство высококонсервативных белков, встречающихся повсеместно у всех видов. Их экспрессия может значительно индуцироваться до гораздо более высоких уровней в результате теплового шока или других форм стрессового воздействия, включая воздействие токсинов, окислительный стресс или депривацию глюкозы. Были классифицированы пять семейств в соответствии с их молекулярной массой: HSP-110, -90, -70, -60 и -28. HSP доставляют иммуногенные пептиды через путь перекрестной презентации в антигенпрезентирующих клетках (APC), таких как макрофаги и дендритные клетки (DC), что приводит к активации Т-клеток. HSP выполняют функцию шаперонов-переносчиков опухолеассоциированных антигенных пептидов, образуя

комплексы, способные индуцировать опухолеспецифический иммунитет. После высвобождения из погибающих опухолевых клеток комплексы HSP-антиген поглощаются антигенпрезентирующими клетками (APC), где антигены процессируются в пептиды, которые связывают молекулы MHC I класса и II класса, что приводит к активации противоопухолевых CD8⁺ и CD4⁺ Т-клеток. Иммунитет, опосредуемый комплексами HSP, полученными из опухолевых препаратов, специфически направлен против уникального репертуара антигенных пептидов, экспрессируемых раком у каждого субъекта. Таким образом, в определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к (а) антителу и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению и (b) вакцине для применения в качестве лекарственного препарата, например, для применения в способе лечения рака. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, набору или комплексу компонентов, содержащему (а) антитело и/или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению и (b) вакцину. В определенных вариантах осуществления вакцина представляет собой противоопухолевую вакцину на основе белка теплового шока. В определенных вариантах осуществления вакцина представляет собой противопатогенную вакцину на основе белка теплового шока. В определенных вариантах осуществления вакцина является такой, как описано в WO 2016/183486, включенной в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00172] Комплекс белок теплового шока-пептид (HSPPC) представляет собой комплекс белок-пептид, состоящий из белка теплового шока, нековалентно связанного в комплекс с антигенными пептидами. HSPPC вызывают как врожденные, так и адаптивные иммунные ответы. В конкретном варианте осуществления антигенный(-ые) пептид(-ы) проявляет(-ют) антигенность в отношении подвергаемого лечению рака. HSPPC эффективно захватываются посредством APC через мембранные рецепторы (в основном CD91) или путем связывания с toll-подобными рецепторами. Интернализация HSPPC приводит к функциональному созреванию APC с продуцированием хемокинов и цитокинов, что приводит к активации натуральных киллеров (NK-клеток), моноцитов и Th1- и Th2-опосредованных иммунных ответов. В определенных вариантах осуществления HSPPC, применяемые в раскрытых в данном документе способах, содержат один или более белков теплового шока из семейства белков стресса hsp60, hsp70 или hsp90 в комплексе с антигенными пептидами. В определенных вариантах осуществления HSPPC содержат hsc70, hsp70, hsp90, hsp110, grp170, grp96, кальретикулин или комбинации из двух или более из них.

[00173] В конкретном варианте осуществления комплекс белок теплового шока-пептид (HSPPC) содержит рекомбинантные белки теплового шока (например, hsp70 или hsc70) или их пептид-связывающую область в комплексе с рекомбинантными антигенными пептидами. Рекомбинантные белки теплового шока можно получить с помощью технологии рекомбинантной ДНК, например, с применением последовательности hsc70 человека, которая описана в Dworniczak and Miraault, Nucleic

Acids Res. 15:5181-5197 (1987) и имеет № доступа в GenBank P11142 и/или Y00371, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В определенных вариантах осуществления последовательности Hsp70 являются такими, как описано в Hunt and Morimoto Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82 (19), 6455-6459 (1985), и имеют № доступа в GenBank P0DMV8 и/или M11717, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Антигенные пептиды также можно получить с помощью способов рекомбинантной ДНК, известных в данной области техники.

[00174] В определенных вариантах осуществления антигенные пептиды содержат модифицированную аминокислоту. В определенных вариантах осуществления модифицированная аминокислота содержит посттрансляционную модификацию. В определенных вариантах осуществления модифицированная аминокислота содержит миметик посттрансляционной модификации. В определенных вариантах осуществления модифицированная аминокислота представляет собой Tyr, Ser, Thr, Arg, Lys или His, которая была фосфорилирована по гидроксилу или амину боковой цепи. В определенных вариантах осуществления модифицированная аминокислота представляет собой миметик аминокислоты Tyr, Ser, Thr, Arg, Lys или His, который был фосфорилирован по гидроксилу или амину боковой цепи.

[00175] В конкретном варианте осуществления раскрытое в данном документе выделенное антитело к TIGIT вводят субъекту в комбинации с комплексом белок теплового шока-пептид (HSPPC), например, комплексом белок теплового шока-96-пептид (HSPPC-96), для лечения рака. HSPPC-96 содержит белок теплового шока (Hsp) размером 96 кДа, gp96, в комплексе с антигенными пептидами. HSPPC-96 является средством противораковой иммунотерапии, изготовленным из опухоли субъекта и содержащее раковый антигенный «отпечаток». В определенных вариантах осуществления такой отпечаток содержит уникальные антигены, которые присутствуют только в специфических раковых клетках данного конкретного субъекта, и инъекция вакцины предназначена для стимуляции иммунной системы субъекта к распознаванию и атаке любых клеток со специфическим раковым отпечатком. Таким образом, в определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителу и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению в комбинации с комплексом белок теплового шока-пептид (HSPPC) для применения в качестве лекарственного препарата и/или для применения в способе лечения рака.

[00176] В определенных вариантах осуществления HSPPC, например HSPPC-96, получают из опухолевой ткани субъекта. В конкретном варианте осуществления, HSPPC (например, HSPPC-96) получают из опухоли определенного типа рака или его метастазов, подвергаемых лечению. В другом конкретном варианте осуществления, HSPPC (например, HSPPC-96) является аутологичным для субъекта, проходящего лечение. В определенных вариантах осуществления опухолевая ткань представляет собой не некротическую опухолевую ткань. В определенных вариантах осуществления для

осуществления схемы вакцинации применяют по меньшей мере 1 грамм (например, по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9 или по меньшей мере 10 грамм) не некротической опухолевой ткани. В определенных вариантах осуществления после хирургической резекции отличную от некротической опухолевую ткань замораживают перед применением для получения вакцины. В определенных вариантах осуществления HSPPC, например HSPPC-96, выделяют из опухолевой ткани методиками очистки, фильтруют и готовят для инъекционной вакцины. В определенных вариантах осуществления субъекту вводят 6-12 доз HSPPC, например HSPPC-96. В таких вариантах осуществления дозы HSPPC, например HSPPC-96, можно вводить еженедельно для первых 4 доз, а затем раз в две недели для 2-8 дополнительных доз.

[00177] Дополнительные примеры HSPPC, которые можно применять в соответствии с описанными в данном документе способами, раскрыты в следующих патентах и патентных заявках, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей: патенты США №№ 6391306, 6383492, 6403095, 6410026, 6436404, 6447780, 6447781 и 6610659.

[00178] В определенных вариантах осуществления раскрытое в данном документе выделенное антитело к TIGIT вводят субъекту в комбинации с адьювантом. В зависимости от специфики лечения можно применять различные адьюванты. Неограничивающие примеры подходящих адьювантов включают без ограничения полный адьювант Фрейнда (CFA), неполный адьювант Фрейнда (IFA), монтанид ISA (неполный адьювант Seppic), систему адьювантов Ribi (RAS), Titer Max, мурамиловые пептиды, состав адьюванта Syntex (SAF), квасцы (гидроксид алюминия и/или фосфат алюминия), адьюванты на основе солей алюминия, адьюванты Gerbu[®], абсорбированный на нитроцеллюлозе антиген, инкапсулированный или захваченный антиген, 3-де-О-ацилированный монофосфориллипид А (3 D-MPL), иммуностимулирующие олигонуклеотиды, лиганды toll-подобного рецептора (TLR), лиганды маннан-связывающего лектина (MBL), агонисты STING, иммуностимулирующие комплексы, такие как сапонины, Quil A, QS-21, QS-7, ISCOMATRIX и другие. Другие адьюванты включают олигонуклеотиды CpG и молекулы двухнитевой РНК, такие как поли(А) и поли(У). Также можно применять комбинации вышеуказанных адьювантов. См., например, патенты США № 6645495, 7029678 и 7858589, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В определенных вариантах осуществления применяемый в данном документе адьювант представляет собой QS-21 STIMULON.

[00179] В определенных вариантах осуществления раскрытое в данном документе выделенное антитело к TIGIT вводят субъекту в комбинации с дополнительным терапевтическим средством, содержащим TCR. В определенных вариантах осуществления дополнительным терапевтическим средством является растворимый TCR. В

определенных вариантах осуществления дополнительным терапевтическим средством является клетка, экспрессирующая TCR. Таким образом, в определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителу и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению в комбинации с дополнительным терапевтическим средством, содержащим TCR, для применения в качестве лекарственного препарата и/или для применения в способе лечения рака.

[00180] В определенных вариантах осуществления раскрытое в данном документе выделенное антитело к TIGIT вводят субъекту в комбинации с клеткой, экспрессирующей химерный антигенный рецептор (CAR). В определенных вариантах осуществления клетка является Т-клеткой.

[00181] В определенных вариантах осуществления раскрытое в данном документе выделенное антитело к TIGIT вводят субъекту в комбинации с имитирующим TCR антителом. В определенных вариантах осуществления имитирующее TCR антитело является антителом, которое специфически связывается с комплексом пептид-MHC. Неограничивающие примеры имитирующих TCR антител см., например, в патенте США № 9074000 и публикациях заявок на патент США №№ US 2009/0304679 A1 и US 2014/0134191 A1, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00182] В определенных вариантах осуществления раскрытое в данном документе выделенное антитело к TIGIT вводят субъекту в комбинации с привлекающим Т-клетки биспецифическим активатором (BiTE) (например, описанным в WO2005061547A2, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте) и/или антителом с двойной аффинностью для повторного нацеливания (DART) (например, описанным в WO2012162067A2, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В определенных вариантах осуществления BiTE и/или DART специфически связываются с опухлеассоциированным антигеном (например, полипептидом, сверхэкспрессируемым в опухоли, полипептидом, полученным из онковируса, полипептидом, содержащим посттрансляционную модификацию, специфичную для опухоли, полипептидом, специфически мутировавшим в опухоли) и молекулой на эффекторной клетке (например, CD3 или CD16). В определенных вариантах осуществления опухлеассоциированный антиген, представляет собой EGFR (например, EGFR человека), где необязательно BiTE и/или DART содержат последовательности VH и VL цетуксимаба. В определенных вариантах осуществления опухлеассоциированный антиген, представляет собой Her2 (например, Her2 человека), где необязательно BiTE и/или DART содержат последовательности VH и VL трастузумаба. В определенных вариантах осуществления опухлеассоциированный антиген представляет собой CD20 (например, CD20 человека).

[00183] Выделенное антитело к TIGIT и дополнительное терапевтическое средство (например, химиотерапевтический препарат, радиотерапевтический препарат, средство, нацеливающееся на контрольную точку иммунного ответа, ингибитор IDO, вакцину,

адъювант, растворимый TCR, клетку, экспрессирующую TCR, клетку, экспрессирующую химерный антигенный рецептор, и/или имитирующее TCR антитело) можно вводить отдельно, последовательно или одновременно в виде отдельных лекарственных форм. В определенных вариантах осуществления выделенное антитело к TIGIT вводят парентерально, а ингибитор IDO вводят перорально.

[00184] Описанные в данном документе антитело или фармацевтическую композицию можно доставлять субъекту различными путями. Они включают без ограничения парентеральный, интраназальный, интратрахеальный, пероральный, внутрикожный, местный, внутримышечный, внутрибрюшинный, трансдермальный, внутривенный, внутриопухолевый, конъюнктивальный, внутриартериальный и подкожный пути введения. Также можно использовать легочное введение, например с применением ингалятора или небулайзера, и состав с образующим аэрозоль средством для применения в виде спрея. В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе антитело или фармацевтическую композицию доставляют подкожно или внутривенно. В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе антитело или фармацевтическую композицию доставляют внутриартериально. В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе антитело или фармацевтическую композицию доставляют внутриопухолевым путем. В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе антитело или фармацевтическую композицию доставляют в лимфатический узел, дренирующий опухоль.

[00185] Количество антитела или композиции, которое будет эффективным при лечении и/или предупреждении состояния, будет зависеть от природы заболевания и может быть определено стандартными клиническими методиками.

[00186] Точная доза, которую следует использовать в композиции, также будет зависеть от пути введения и тяжести инфекции или вызванного ею заболевания и должна определяться в соответствии с мнением практикующего врача и обстоятельствами каждого субъекта. Например, эффективные дозы могут также варьироваться в зависимости от способа введения, целевого участка, физиологического состояния пациента (включая возраст, вес тела и состояние здоровья), того, является ли пациент человеком или животным, других вводимых лекарственных препаратов или является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Обычно пациентом является человек, но также можно лечить отличных от человека млекопитающих, включая трансгенных млекопитающих. Для оптимизации безопасности и эффективности лечебные дозировки подвергают оптимальной титрации.

[00187] Описанное в данном документе выделенное антитело к TIGIT можно также применять для анализа уровней белка TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) в биологическом образце с применением классических иммуногистологических способов, известных специалистам в данной области техники, включая иммуноанализы, такие как твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA),

иммунопреципитация или вестерн-блоттинг. Подходящие метки для анализа антител известны в данной области техники и включают ферментативные метки, такие как глюкозооксидаза; радиоизотопы, такие как йод (^{125}I , ^{121}I), углерод (^{14}C), сера (^{35}S), тритий (^3H), индий (^{121}In) и технеций (^{99}Tc); люминесцентные метки, такие как люминол; и флуоресцентные метки, такие как флуоресцеин и родамин, и биотин. Такие метки можно применять для мечения описанного в данном документе антитела. В качестве альтернативы можно пометить второе антитело, которое распознает описанное в данном документе выделенное антитело к TIGIT, и применять его в комбинации с выделенным антителом к TIGIT для выявления уровней белка TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака). Таким образом, в определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению выделенного антитела к TIGIT по настоящему изобретению для выявления *in vitro* белка TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) в биологическом образце. В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению выделенного антитела к TIGIT по настоящему изобретению для оценки и/или выявления уровней белка TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) в биологическом образце *in vitro*, где необязательно антитело к TIGIT конъюгировано с радионуклидом или детектируемой меткой и/или несет метку, описанную в данном документе, и/или где применяют иммуногистологический способ.

[00188] Подразумевается, что анализ уровня экспрессии белка TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) включает качественное или количественное измерение или оценку уровня белка TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) в первом биологическом образце либо непосредственно (например, путем определения или оценки абсолютного уровня белка), либо относительно (например, путем сравнения с уровнем белка, ассоциированного с заболеванием, во втором биологическом образце). Можно измерить или оценить уровень экспрессии полипептида TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) в первом биологическом образце и сравнить со стандартным уровнем белка TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), при этом стандарт берется, например, из второго биологического образца, полученного от индивидуума, не имеющего нарушения, или определяется путем усреднения уровней из популяции индивидуумов, не имеющих данного нарушения. Как будет понятно в данной области техники, после того, как станет известен «стандартный» уровень полипептида TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), его можно применять повторно в качестве стандарта для сравнения. Следовательно, в дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу анализа и/или выявления уровней белка TIGIT *in vitro*, например, уровней белка TIGIT человека, в биологическом образце, включающему качественное или количественное измерение или оценку уровня белка TIGIT, например, белка TIGIT человека, в биологическом образце иммуногистологическим способом.

[00189] Применяемый в данном документе термин «биологический образец»

относится к любому биологическому образцу, полученному из субъекта, линии клеток, ткани или другого источника клеток, потенциально экспрессирующих TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака). Способы получения биоптатов ткани и биологических жидкостей из животных (например, людей или яванских макаков) хорошо известны в данной области техники. Биологические образцы включают моноклеарные клетки периферической крови (PBMC).

[00190] Описанное в данном документе выделенное антитело к TIGIT можно применять для прогностических, диагностических, мониторинговых и скрининговых вариантов применения, включая варианты применения *in vitro* и *in vivo*, хорошо известные и стандартные для специалистов в данной области техники и основанные на настоящем описании. Прогностический, диагностический, мониторинговый и скрининговый анализы и наборы для определения и оценки статуса иммунной системы и/или иммунного ответа *in vitro* можно использовать для предсказания, диагностики и мониторинга, чтобы оценивать образцы пациентов, включая тех, у которых имеется дисфункция иммунной системы или подозревается ее наличие, или с точки зрения ожидаемого или требуемого ответа иммунной системы, ответа на антиген или ответа на вакцину. Оценка и анализ статуса иммунной системы и/или иммунного ответа также применимы при определении пригодности пациента для клинического испытания лекарственного средства или для введения конкретного химиотерапевтического средства, радиотерапевтического средства или антитела, в том числе их комбинаций, в сравнении с другим средством или антителом. Данный тип прогностического и диагностического мониторинга и оценки уже применяется на практике с использованием антител к белку HER2 при раке молочной железы (HerceptestTM, Dako), при этом анализ также применяют для оценки пациентов в отношении терапии антителами с применением препарата Herceptin[®]. Варианты применения *in vivo* включают направленную клеточную терапию и модуляцию иммунной системы, а также радиовизуализацию иммунных ответов. Следовательно, в определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителу к TIGIT и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для применения в качестве диагностического средства. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к выделенному антителу к TIGIT и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для применения в способе предсказания, диагностики и/или мониторинга субъекта, у которого имеется дисфункция иммунной системы или подозревается ее наличие, и/или с точки зрения ожидаемого или требуемого ответа иммунной системы, ответа на антиген или ответа на вакцину. В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению выделенного антитела к TIGIT по настоящему изобретению для предсказания, диагностики и/или мониторинга субъекта, у которого имеется дисфункция иммунной системы или подозревается ее наличие, и/или с точки зрения ожидаемого или требуемого ответа иммунной системы, ответа на антиген или ответа на вакцину путем анализа и/или выявления уровней белка TIGIT человека в биологическом образце субъекта *in vitro*.

[00191] В определенных вариантах осуществления выделенное антитело к TIGIT можно применять при иммуногистохимическом анализе образцов биопсии. В определенных вариантах осуществления способ является способом *in vitro*. В другом варианте осуществления выделенное антитело к TIGIT можно применять для выявления уровней TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) или уровней клеток, содержащих TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) на поверхности своих мембран, при этом уровни затем можно связать с определенными симптомами заболевания. Описанные в данном документе выделенные антитела к TIGIT могут нести выявляемую или функциональную метку и/или могут быть конъюгированы с радионуклидом или выявляемой меткой. Если применяются флуоресцентные метки, доступную в настоящее время микроскопию и анализ с помощью сортера флуоресцентно-активированных клеток (FACS) или комбинацию процедур обоих способов, которые известны в данной области техники, можно использовать для идентификации и количественного определения членов специфического связывания. Описанные в данном документе выделенные антитела к TIGIT могут нести флуоресцентную метку или могут быть конъюгированы с ней. Примеры флуоресцентных меток включают, например, реакционно-способный и конъюгированный зонды, например, аминкумарин, флуоресцеин и техасский красный, красители Alexa Fluor, красители Cy и красители DyLight. Выделенное антитело к TIGIT может нести радиоактивную метку или радионуклид, такие как изотопы ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{117}Lu , ^{121}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{198}Au , ^{211}At , ^{213}Bi , ^{225}Ac и ^{186}Re , или может быть конъюгировано с ними. Если применяются радиоактивные метки, доступные в настоящее время процедуры подсчета, известные в данной области техники, можно использовать для идентификации и количественного определения специфического связывания выделенного антитела к TIGIT с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака). В случае, когда метка представляет собой фермент, выявление можно выполнить с помощью любой из используемых в настоящее время колориметрических, спектрофотометрических, флуороспектрофотометрических, амперометрических или газометрических методик, известных в данной области техники. Это можно осуществить путем приведения образца или контрольного образца в контакт с выделенным антителом к TIGIT в условиях, которые обеспечивают образование комплекса между антителом к TIGIT и TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака). Любые комплексы, образованные между антителом к TIGIT и TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), выявляют и сравнивают в образце и контроле. В свете специфического связывания описанных в данном документе антител к TIGIT с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) антитела к TIGIT можно применять для специфического выявления TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака). Описанные в данном документе антитела к TIGIT также можно применять для очистки TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) посредством иммуноаффинной очистки. Сюда также включена аналитическая система,

которая может быть получена в форме набора для тестирования, набора или комплекта компонентов для количественного анализа степени присутствия, например, комплексов TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)/ лиганда TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака). Система, набор для тестирования, набор или комплект компонентов могут содержать меченый компонент, например меченое антитело, и один или более дополнительных иммунохимических реагентов.

7.5 Полинуклеотиды, векторы и способы получения антител

[00192] В другом аспекте в данном документе предусмотрены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую описанное в данном документе антитело, или его часть, или его фрагмент (например, VL и/или VH и легкую цепь и/или тяжелую цепь), которые специфически связываются с антигеном TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), и векторы, например, векторы, содержащие такие полинуклеотиды, для рекомбинантной экспрессии в клетках-хозяевах (например, *E. coli* и клетках млекопитающих). В данном документе предусмотрены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие тяжелую и/или легкую цепь любого из представленных в данном документе антител, а также векторы, содержащие такие полинуклеотидные последовательности, например, векторы экспрессии для их эффективной экспрессии в клетках-хозяевах, например, клетках млекопитающих.

[00193] Применяемый в данном документе термин «выделенные» полинуклеотид или молекула нуклеиновой кислоты обозначает молекулу, которая отделена от других молекул нуклеиновой кислоты, присутствующих в природном источнике (например, у мыши или человека) молекулы нуклеиновой кислоты. Более того, «выделенная» молекула нуклеиновой кислоты, такая как молекула кДНК, может по сути не содержать другого клеточного материала или культуральной среды при получении с помощью рекомбинантных методик или по сути не содержать химических предшественников или других химических веществ при химическом синтезе. Например, формулировка «по сути не содержит» включает препараты на основе полинуклеотида или молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие менее приблизительно 15%, 10%, 5%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% (в частности, менее приблизительно 10%) другого материала, например, клеточного материала, культуральной среды, других молекул нуклеиновых кислот, химических предшественников и/или других химических веществ. В конкретном варианте осуществления молекула(-ы) нуклеиновой кислоты, кодирующая(-ие) описанное в данном документе антитело, является(-ются) выделенной(-ыми) или очищенной(-ыми).

[00194] В конкретных аспектах в данном документе предусмотрены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие антитела, которые специфически связываются с полипептидом TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) и содержат описываемую в данном документе аминокислотную последовательность, а также антитела, которые конкурируют с такими антителами за связывание с полипептидом TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT

яванского макака) (например, дозозависимым образом) или которые связываются с тем же эпитопом, что и такие антитела.

[00195] В определенных аспектах в данном документе предусмотрены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь или тяжелую цепь описанного в данном документе антитела. Полинуклеотиды могут содержать нуклеотидные последовательности, кодирующие легкую цепь, содержащую FR и CDR VL из описанных в данном документе антител (см., например, таблицу 1), или нуклеотидные последовательности, кодирующие тяжелую цепь, содержащую FR и CDR VH из описанных в данном документе антител (см., например, таблицу 1). В определенных вариантах осуществления полинуклеотид кодирует VH, VL, тяжелую цепь и/или легкую цепь, описанные в данном документе. В другом варианте осуществления полинуклеотид кодирует первую VH и первую VL, описанные в данном документе. В другом варианте осуществления полинуклеотид кодирует вторую VH и вторую VL, описанные в данном документе. В другом варианте осуществления полинуклеотид кодирует первую тяжелую цепь и первую легкую цепь, описанные в данном документе. В другом варианте осуществления полинуклеотид кодирует вторую тяжелую цепь и вторую легкую цепь, описанные в данном документе. В другом варианте осуществления полинуклеотид кодирует VH и/или VL или тяжелую цепь и/или легкую цепь описанного в данном документе выделенного антитела.

[00196] В данном документе также представлены полинуклеотиды, кодирующие выделенное антитело к TIGIT, которые оптимизированы, например, путем оптимизации кодонов/РНК, замены на гетерологичные сигнальные последовательности и устранения элементов нестабильности в мРНК. Способы получения оптимизированных нуклеиновых кислот, кодирующих выделенное антитело к TIGIT или его фрагмент (например, легкую цепь, тяжелую цепь, домен VH или домен VL) для рекомбинантной экспрессии, путем введения изменений в кодоны и/или устранения ингибирующих областей в мРНК можно осуществлять путем адаптации способов оптимизации, описанных, например, в патентах США №№ 5965726; 6174666; 6291664; 6414132 и 6794498 соответственно, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Например, потенциальные сайты сплайсинга и элементы нестабильности (например, элементы, богатые А/Т или А/У) в пределах РНК можно подвергнуть мутации без изменения аминокислот, кодируемых последовательностями нуклеиновых кислот, для повышения стабильности РНК при рекомбинантной экспрессии. При изменениях используют вырожденность генетического кода, например, использование альтернативного кодона для идентичной аминокислоты. В определенных вариантах осуществления может быть желательным изменение одного или более кодонов для кодирования консервативной мутации, например, подобной аминокислоты с подобной химической структурой и свойствами и/или функцией, что и исходная аминокислота. Такие способы могут обеспечивать повышение экспрессии выделенного антитела к TIGIT или его фрагмента в по меньшей мере 1 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60

раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз или больше относительно экспрессии выделенного антитела к TIGIT, кодируемого полинуклеотидами, которые не были оптимизированы.

[00197] В определенных вариантах осуществления оптимизированную полинуклеотидную последовательность, кодирующую описанное в данном документе выделенное антитело к TIGIT или его фрагмент (например, домен VL и/или домен VH), можно гибридизировать с антисмысловым (например, комплементарным) полинуклеотидом из неоптимизированной полинуклеотидной последовательности, кодирующей описанное в данном документе выделенное антитело к TIGIT или его фрагмент (например, домен VL и/или домен VH). В конкретных вариантах осуществления оптимизированная нуклеотидная последовательность, кодирующая описанное в данном документе выделенное антитело к TIGIT или фрагмент, гибридизуется в условиях высокой жесткости с антисмысловым полинуклеотидом из неоптимизированной полинуклеотидной последовательности, кодирующей описанное в данном документе выделенное антитело к TIGIT или его фрагмент. В конкретном варианте осуществления оптимизированная нуклеотидная последовательность, кодирующая описанное в данном документе выделенное антитело к TIGIT или его фрагмент, гибридизуется в условиях гибридизации высокой жесткости, промежуточной или более низкой жесткости с антисмысловым полинуклеотидом из неоптимизированной нуклеотидной последовательности, кодирующей описанное в данном документе выделенное антитело к TIGIT или его фрагмент. Информация, касающаяся условий гибридизации была описана, см., например, публикацию заявки на патент США № US 2005/0048549 (например, абзацы 72-73), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00198] Полинуклеотиды можно получить и определить нуклеотидную последовательность полинуклеотидов любым способом, известным в данной области техники. Нуклеотидные последовательности, кодирующие описанные в данном документе антитела, например, антитела, описанные в таблице 1, и модифицированные версии данных антител, можно определить с применением способов, хорошо известных в данной области техники, т. е. нуклеотидные кодоны, о которых известно, что они кодируют конкретные аминокислоты, собирают таким образом, чтобы получить нуклеиновую кислоту, которая кодирует антитело. Такой полинуклеотид, кодирующий антитело, можно собрать из химически синтезированных олигонуклеотидов (например, как описано у Kutmeier G *et al.*, (1994), *BioTechniques* 17: 242-6, включенной в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте), что, вкратце, предусматривает синтез перекрывающихся олигонуклеотидов, содержащих части последовательности, кодирующей антитело, отжиг и лигирование этих олигонуклеотидов, а затем амплификацию лигированных олигонуклеотидов с помощью ПЦР.

[00199] В качестве альтернативы полинуклеотид, кодирующий описанную в данном документе антигенсвязывающую область или описанное в данном документе антитело, можно получить из нуклеиновой кислоты из подходящего источника (например, гибридомы) с применением способов, хорошо известных в данной области техники

(например, ПЦР и других способов молекулярного клонирования). Например, ПЦР-амплификацию с применением синтетических праймеров, способных гибридизоваться с 3'- и 5'-концами известной последовательности, можно осуществить с применением геномной ДНК, полученной из гибридомных клеток, продуцирующих представляющее интерес антитело. Такие способы ПЦР-амплификации можно применять для получения нуклеиновых кислот, содержащих последовательность, кодирующую легкую цепь и/или тяжелую цепь антитела. Такие способы ПЦР-амплификации можно применять для получения нуклеиновых кислот, содержащих последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи и/или переменную область тяжелой цепи антитела. Амплифицированные нуклеиновые кислоты можно клонировать в векторы для экспрессии в клетках-хозяевах и для дальнейшего клонирования.

[00200] Если клон, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую конкретную антигенсвязывающую область или антитело, не доступен, но известна последовательность антигенсвязывающей области или молекулы антитела, нуклеиновую кислоту, кодирующую иммуноглобулин, можно синтезировать химически или получить из подходящего источника (например, библиотеки кДНК антител или библиотеки кДНК, полученной из любой ткани или клеток, экспрессирующих антитело, таких как гибридомные клетки, отобранные для экспрессии описанного в данном документе антитела, или нуклеиновой кислоты, предпочтительно поли-А⁺ РНК, выделенной из них) путем ПЦР-амплификации с применением синтетических праймеров, способных гибридизоваться с 3'- и 5'-концами последовательности, или путем клонирования с применением олигонуклеотидного зонда, специфического в отношении конкретной последовательности гена, например, для идентификации из библиотеки кДНК клон кДНК, который кодирует антитело. Амплифицированные нуклеиновые кислоты, полученные с помощью ПЦР, затем можно клонировать в реплицируемые клонирующие векторы с применением любого способа, хорошо известного в данной области техники.

[00201] ДНК, кодирующую описанные в данном документе выделенные антитела к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), можно легко выделить и секвенировать с применением традиционных процедур (например, с применением олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антител к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)). Источником такой ДНК могут служить гибридомные клетки. После выделения ДНК можно поместить в векторы экспрессии, которые затем трансфицируют в клетки-хозяева, такие как клетки *E. coli*, обезьяньи клетки COS, клетки яичника китайского хомячка (CHO) (например, клетки CHO из CHO GS System™ (Lonza)) или клетки миеломы, которые в иных обстоятельствах не продуцируют белок иммуноглобулина, для обеспечения синтеза антител к TIGIT в рекомбинантных клетках-хозяевах.

[00202] Чтобы получить полноразмерные антитела или антигенсвязывающие области, для амплификации последовательностей VH или VL в клонах scFv можно

применять ПЦР-праймеры, включающие нуклеотидные последовательности VH или VL, сайт рестрикции и фланкирующую последовательность для защиты сайта рестрикции. Используя методики клонирования, известные специалистам в данной области техники, домены VH, амплифицированные с помощью ПЦР, можно клонировать в векторы, экспрессирующие константную область тяжелой цепи, например, человеческую константную область гамма-1 или гамма-4, а домены VL, амплифицированные с помощью ПЦР, можно клонировать в векторы, экспрессирующие константную область легкой цепи, например, человеческие константные области каппа- или лямбда-цепи. В определенных вариантах осуществления векторы для экспрессии доменов VH или VL содержат промотор EF-1 α , сигнал секреции, сайт клонирования для вариабельной области, константные области и маркер для отбора, такой как ген устойчивости к неомичину. Домены VH и VL также можно клонировать в один вектор, экспрессирующий необходимые константные области. Затем с применением методик, известных специалистам в данной области техники, векторы конверсии тяжелой цепи и векторы конверсии легкой цепи совместно трансфицируют в линии клеток с получением стабильных или временных линий клеток, которые экспрессируют полноразмерные антитела, например IgG.

[00203] ДНК также можно модифицировать, например, путем замены кодирующей последовательности для человеческих константных областей тяжелой и легкой цепи, вместо мышинных последовательностей или путем ковалентного присоединения к кодирующей последовательности иммуноглобулина всей или части кодирующей последовательности для отличного от иммуноглобулина полипептида.

[00204] Также предусмотрены полинуклеотиды, которые гибридизируются в условиях гибридизации высокой жесткости, промежуточной или более низкой жесткости с полинуклеотидами, кодирующими описанное в данном документе антитело. В конкретных вариантах осуществления описанные в данном документе полинуклеотиды гибридизируются в условиях гибридизации высокой жесткости, промежуточной или более низкой жесткости с полинуклеотидами, кодирующими домен VH и/или домен VL, предусмотренные в данном документе.

[00205] Условия гибридизации были описаны в данной области техники и известны специалисту в данной области техники. Например, гибридизация в жестких условиях может включать гибридизацию со связанной на фильтре ДНК в 6-кратном растворе хлорида натрия/цитрата натрия (SSC) при температуре приблизительно 45°C с последующей одной или более промывками в 0,2xSSC/0,1% SDS при температуре приблизительно 50-65°C; гибридизация в очень жестких условиях может включать гибридизацию со связанной на фильтре нуклеиновой кислотой в 6xSSC при температуре приблизительно 45°C с последующей одной или более промывками в 0,1xSSC/0,2% SDS при температуре приблизительно 68°C. Гибридизация в других жестких условиях гибридизации известна специалистам в данной области техники и была описана, см., например, Ausubel FM *et al.*, eds., (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. I,

Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., New York, на страницах 6.3.1-6.3.6 и 2.10.3, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00206] В определенных аспектах в данном документе предусмотрены клетки (например, клетки-хозяева), экспрессирующие (например, рекомбинантно) описанные в данном документе антитела, которые специфически связываются с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), и родственные полинуклеотиды и векторы экспрессии. В данном документе предусмотрены векторы (например, векторы экспрессии), содержащие полинуклеотиды, которые содержат нуклеотидные последовательности, кодирующие антитела к TIGIT или фрагмент, для рекомбинантной экспрессии в клетках-хозяевах, предпочтительно в клетках млекопитающих (например, клетках CHO). В данном документе также предусмотрены клетки-хозяева, содержащие такие векторы для рекомбинантной экспрессии описанных в данном документе антител к TIGIT (например, человеческого или гуманизированного антитела). В конкретном аспекте в данном документе предусмотрены способы получения описанного в данном документе антитела, включающие экспрессию антитела в клетке-хозяине.

[00207] Рекомбинантная экспрессия описанного в данном документе антитела (например, полноразмерной антигенсвязывающей области, или антитела, или тяжелой и/или легкой цепи описанного в данном документе антитела), которое специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), в целом предусматривает конструирование вектора экспрессии, содержащего полинуклеотид, который кодирует антитело. После того как был получен полинуклеотид, кодирующий описанные в данном документе молекулу антитела, тяжелую и/или легкую цепь антитела или их фрагмент (например, переменные области тяжелой и/или легкой цепи), вектор для продуцирования молекулы антитела можно получить с помощью технологии рекомбинантной ДНК с применением методик, хорошо известных в данной области техники. Таким образом, в данном документе описаны способы получения белка путем экспрессии полинуклеотида, содержащего нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело или фрагмент антитела (например, легкую цепь или тяжелую цепь). Способы, которые хорошо известны специалистам в данной области техники, можно применять для конструирования векторов экспрессии, содержащих последовательности, кодирующие антитело или фрагмент антитела (например, легкую цепь или тяжелую цепь), и соответствующие сигналы контроля транскрипции и трансляции. Данные способы включают, например, методики рекомбинантной ДНК *in vitro*, методики синтеза и генетической рекомбинации *in vivo*. Также предусмотрены реплицируемые векторы, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую описываемые в данном документе молекулу антитела, тяжелую или легкую цепь антитела, переменную область тяжелой или легкой цепи антитела или их фрагмент или CDR тяжелой или легкой цепи, функционально связанную с промотором. Такие векторы могут, например, включать нуклеотидную последовательность, кодирующую константную

область молекулы антитела (см., например, международные публикации №№ WO 86/05807 и WO 89/01036 и патент США № 5122464, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте), а переменные области антитела можно клонировать в такой вектор для экспрессии полноразмерной тяжелой, полноразмерной легкой цепи или обеих полноразмерных тяжелой и легкой цепей.

[00208] В определенных вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VH, VL, тяжелую цепь и/или легкую цепь описанного в данном документе антитела. В другом варианте осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VH и VL описанного в данном документе антитела. В другом варианте осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь и легкую цепь описанного в данном документе антитела.

[00209] Вектор экспрессии можно перенести в клетку (например, клетку-хозяина) с помощью традиционных методик, а полученные клетки затем можно культивировать с помощью традиционных методик с получением продукта, содержащего описанное в данном документе антитело или его фрагмент. Таким образом, в данном документе предусмотрены клетки-хозяева, содержащие полинуклеотид, кодирующий описанное в данном документе антитело, или его фрагменты, или его тяжелую или легкую цепь, или ее фрагмент, или описанное в данном документе одноцепочечное антитело, функционально связанный с промотором для экспрессии таких последовательностей в клетке-хозяине.

[00210] В определенных вариантах осуществления клетка-хозяин содержит полинуклеотид, кодирующий VH и VL описанного в данном документе выделенного антитела. В другом варианте осуществления клетка-хозяин содержит вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий VH и VL описанного в данном документе выделенного антитела. В другом варианте осуществления клетка-хозяин содержит первый полинуклеотид, кодирующий VH описанного в данном документе выделенного антитела, и второй полинуклеотид, кодирующий VL описанного в данном документе выделенного антитела. В другом варианте осуществления клетка-хозяин содержит первый вектор, содержащий первый полинуклеотид, кодирующий VH описанного в данном документе выделенного антитела, и второй вектор, содержащий второй полинуклеотид, кодирующий VL описанного в данном документе выделенного антитела.

[00211] В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь/переменная область тяжелой цепи, экспрессируемая первой клеткой, связывается с легкой цепью/переменной областью легкой цепи из второй клетки с образованием описанного в данном документе антитела к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака). В определенных вариантах осуществления в данном документе предусмотрена популяция клеток-хозяев, содержащая такую первую клетку-хозяина и такую вторую клетку-хозяина.

[00212] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрена популяция векторов, содержащая первый вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий легкую цепь/переменную область легкой цепи из описанного в данном

документе антитела к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), и второй вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь/вариабельную область тяжелой цепи из описанного в данном документе антитела к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака).

[00213] Для экспрессии молекул описанных в данном документе молекул антитела можно использовать различные системы хозяин-вектор экспрессии (см., например, патент США № 5807715, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Такие системы хозяин-вектор экспрессии представляют среды-носители, с помощью которых могут быть получены и впоследствии очищены представляющие интерес кодирующие последовательности, а также представляют клетки, которые, будучи трансформированы или трансфицированы соответствующими нуклеотидными кодирующими последовательностями, могут экспрессировать описанную в данном документе молекулу антитела *in situ*. Они включают без ограничения микроорганизмы, такие как бактерии (например, *E. coli* и *B. subtilis*), трансформированные, например, векторами экспрессии на основе рекомбинантной ДНК бактериофага, плазмидной ДНК или космидной ДНК, содержащими кодирующие последовательности для антитела; дрожжи (например, *Saccharomyces* и *Pichia*) трансформированные, например, рекомбинантными векторами экспрессии для дрожжей, содержащими кодирующие последовательности для антитела; системы на основе клеток насекомых, инфицированные, например, рекомбинантными вирусными векторами экспрессии (например, бакуловирусом), содержащими кодирующие последовательности для антитела; системы на основе растительных клеток (например, зеленых водорослей, такие как *Chlamydomonas reinhardtii*), инфицированные, например, рекомбинантными вирусными векторами экспрессии (например, вирусом мозаики цветной капусты, CaMV; вирусом табачной мозаики, TMV) или трансформированные, например, рекомбинантными плазмидными векторами экспрессии (например, Ti-плазмидой), содержащими кодирующие последовательности для антитела; или системы на основе клеток млекопитающих (например, COS (например, COS1 или COS), клетки CHO, ВНК, MDCK, HEK 293, NS0, PER.C6, VERO, CRL7030, HsS78Bst, HeLa и NIH 3T3, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, B-W, L-M, BSC1, BSC40, YB/20 и BMT10), несущие, например, рекомбинантные конструкции экспрессии, содержащие промоторы, полученные из генома клеток млекопитающих (например, промотор металлотioneина) или из вирусов млекопитающих (например, поздний промотор аденовируса; промотор 7,5К вируса коровьей оспы). В конкретном варианте осуществления клетки для экспрессии описанных в данном документе антител представляют собой клетки яичника китайского хомячка (CHO), например, клетки CHO из CHO GS System™ (Lonza). В определенных вариантах осуществления тяжелая цепь и/или легкая цепь антитела, продуцируемого клеткой CHO, может иметь N-концевой остаток глутамина или глутамата, замененный пироглутаматом. В определенных вариантах осуществления клетки для экспрессии описанных в данном документе антител представляют собой человеческие клетки, например, линии

человеческих клеток. В конкретном варианте осуществления вектор экспрессии для клеток млекопитающего представляет собой рOptiVEC™ или рсDNA3.3. В определенных вариантах осуществления для экспрессии молекулы рекомбинантного антитела, в частности, для экспрессии полноразмерной молекулы рекомбинантного антитела, применяют бактериальные клетки, такие как *Escherichia coli*, или эукариотические клетки (например, клетки млекопитающих). Например, эффективная система для экспрессии антител представляет собой клетки млекопитающих, такие как клетки CHO, в сочетании с вектором, таким как промоторный элемент основного промежуточно раннего гена человеческого цитомегаловируса (Foecking MK & Hofstetter H (1986) *Gene* 45: 101-5; и Cockett MI *et al.*, (1990) *Biotechnology* 8(7): 662-7, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе антитела продуцируются клетками CHO или клетками NS0. В конкретном варианте осуществления экспрессия нуклеотидных последовательностей, кодирующих описанные в данном документе антитела, которые специфически связываются с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), регулируется конститутивным промотором, индуцируемым промотором или тканеспецифическим промотором.

[00214] В бактериальных системах можно предпочтительно выбрать ряд векторов экспрессии в зависимости от предполагаемого применения экспрессируемой молекулы антитела. Например, когда необходимо получение большого количества такого антитела для получения фармацевтических композиций на основе молекулы антитела, могут потребоваться векторы, которые управляют экспрессией высоких уровней продуктов слитых белков, которые легко очистить. Такие векторы включают без ограничения вектор экспрессии рUR278 для *E. coli* (Ruether U & Mueller-Hill B (1983) *EMBO J* 2: 1791-1794), в котором кодирующая последовательность может быть лигирована отдельно в вектор в рамке считывания с кодирующей областью *lac Z*, так что образуется слитый белок; векторы рIN (Inouye S & Inouye M (1985) *Nuc Acids Res* 13: 3101-3109; Van Heeke G & Schuster SM (1989) *J Biol Chem* 24: 5503-5509; и т. п., все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Например, векторы рGEX также можно применять для экспрессии чужеродных полипептидов в виде слитых белков с глутатион-5-трансферазой (GST). В целом такие слитые белки являются растворимыми и могут быть легко очищены из лизированных клеток путем адсорбции и связывания с гранулами, содержащими матрикс из глутатион-агарозы, с последующим элюированием в присутствии свободного глутатиона. Векторы рGEX сконструированы так, чтобы они включали сайты расщепления протеазой по типу тромбина или фактора Ха, вследствие чего клонированный продукт целевого гена может высвободиться от фрагмента GST.

[00215] В системе на основе клеток насекомых в качестве вектора для экспрессии чужеродных генов можно применять, например, вирус ядерного полиэдрома *Autographa californica* (AcNPV). Вирус выращивают в клетках *Spodoptera frugiperda*. Кодирующую последовательность можно клонировать отдельно в несущественные области вируса

(например, ген полиэдрина) и поместить под контроль промотора AcNPV (например, промотора гена полиэдрина).

[00216] В клетках-хозяевах, представляющих собой клетки млекопитающих, можно использовать ряд систем экспрессии на основе вирусов. В случаях, когда в качестве вектора экспрессии применяют аденовирус, представляющую интерес кодирующую последовательность можно лигировать с комплексом контроля транскрипции/трансляции аденовируса, например, с поздним промотором и трехкомпонентной лидерной последовательностью. Затем этот химерный ген можно вставить в геном аденовируса посредством рекомбинации *in vitro* или *in vivo*. Вставка в несущественную область вирусного генома (например, область E1 или E3) приведет к получению рекомбинантного вируса, который является жизнеспособным и способен экспрессировать молекулу в инфицированных хозяевах (см., например, Logan J & Shenk T (1984) PNAS 81(12): 3655-9, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Для эффективной трансляции вставленных кодирующих последовательностей также могут потребоваться специфические сигналы инициации. Данные сигналы включают кодон инициации ATG и смежные последовательности. Более того, кодон инициации должен быть синхронизирован с рамкой считывания требуемой кодирующей последовательности, чтобы гарантировать трансляцию вставки целиком. Данные экзогенные сигналы контроля трансляции и кодоны инициации могут иметь различные источники происхождения, как естественные, так и синтетические. Эффективность экспрессии можно повысить путем включения соответствующих энхансерных элементов транскрипции, терминаторов транскрипции и т. д (см., например, Bitter G *et al.*, (1987) Methods Enzymol. 153: 516-544, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

[00217] Кроме того, можно выбрать штамм клетки-хозяина, который модулирует экспрессию вставленных последовательностей или модифицирует и процессирует генный продукт требуемым специфическим образом. Такие модификации (например, гликозилирование) и процессинг (например, расщепление) белковых продуктов могут быть важны для функции белка. Различные клетки-хозяева имеют характерные и специфические механизмы посттрансляционного процессинга и модификации белков и генных продуктов. Для обеспечения правильной модификации и процессинга экспрессируемого чужеродного белка можно выбрать подходящие линии клеток или системы-хозяева. С этой целью можно применять клетки-хозяева, представляющие собой эукариотические клетки, которые обладают клеточным механизмом для надлежащего процессинга первичного транскрипта, гликозилирования и фосфорилирования генного продукта. Такие клетки-хозяева, представляющие собой клетки млекопитающих, включают без ограничения клетки CHO, VERO, BHK, HeLa, MDCK, HEK 293, NIH 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 и T47D, NS0 (линия клеток мышинной миеломы, которая эндогенно не продуцирует какие-либо цепи иммуноглобулина), CRL7030, COS (например, COS1 или COS), PER.C6, VERO, HsS78Bst, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, B-W, L-M, BSC1, BSC40, YB/20, BMT10 и HsS78Bst. В

определенных вариантах осуществления описанные в данном документе антитела к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) продуцируются в клетках млекопитающих, таких как клетки CHO.

[00218] В конкретном варианте осуществления описанные в данном документе антитела характеризуются сниженным содержанием фукозы или совсем не содержат фукозу. Такие антитела можно получить с применением методик, известных специалистам в данной области техники. Например, антитела можно экспрессировать в клетках с дефицитом способности к фукозилрованию или отсутствием такой способности. В конкретном примере для получения антител со сниженным содержанием фукозы можно применять линии клеток с нокаутом по обоим аллелям α 1,6-фукозилтрансферазы. Примером такой системы, которую можно применять для получения антител со сниженным содержанием фукозы, является система Potelligent[®] (Lonza).

[00219] Для долгосрочного высокопродуктивного продуцирования рекомбинантных белков можно создать клетки со стабильной экспрессией. Например, можно сконструировать линии клеток, которые стабильно экспрессируют описанное в данном документе антитело к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака). В конкретных вариантах осуществления представленная в данном документе клетка стабильно экспрессирует легкую цепь/вариабельную область легкой цепи и тяжелую цепь/вариабельную область тяжелой цепи, которые связываются с образованием антигенсвязывающей области или описанного в данном документе антитела.

[00220] В определенных аспектах вместо применения векторов экспрессии, которые содержат вирусные точки начала репликации, клетки-хозяева можно трансформировать с помощью ДНК, находящейся под контролем соответствующих элементов контроля экспрессии (например, промотора, энхансера, последовательностей, терминаторов транскрипции, сайтов полиаденилирования и т. д.) и содержащей селективируемый маркер. После введения чужеродной ДНК/полинуклеотида сконструированные клетки можно оставить расти в течение 1-2 дней в обогащенной среде, а затем перенести их в селективную среду. Селективируемый маркер в рекомбинантной плазмиде придает устойчивость при селекции и позволяет клеткам стабильно интегрировать плазмиду в свои хромосомы и расти с образованием очагов, которые, в свою очередь, можно клонировать и размножить в линии клеток. Такой способ можно с успехом применять для конструирования линий клеток, которые экспрессируют описанное в данном документе антитело к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) или его фрагмент. Такие сконструированные линии клеток могут быть особенно применимы для скрининга и оценки композиций, которые прямо или опосредованно взаимодействуют с молекулой антитела.

[00221] Можно применять ряд систем отбора, включая без ограничения гены тимидинкиназы вируса простого герпеса (Wigler M *et al.*, (1977) Cell 11(1): 223-32); гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазы (Szybalska EH & Szybalski W (1962) PNAS

48(12): 2026-2034); и аденинфосфорибозилтрансферазы (Lowy I *et al.*, (1980) Cell 22(3): 817-23) в tk-, hgprrt- или aprt- клетках соответственно, при этом все вышеупомянутые источники включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Кроме того, устойчивость к антиметаболитам может применяться в качестве основы для отбора по следующим генам: *dhfr*, который придает устойчивость к метотрексату (Wigler M *et al.*, (1980) PNAS 77(6): 3567-70; O'Hare K *et al.*, (1981) PNAS 78: 1527-31); *gpt*, который придает устойчивость к микофеноловой кислоте (Mulligan RC & Berg P (1981) PNAS 78(4): 2072-6); neo, который придает устойчивость к аминогликозидам G-418 (Wu GY & Wu CH (1991) Biotherapy 3: 87-95; Tolstoshev P (1993) Ann Rev Pharmacol Toxicol 32: 573-596; Mulligan RC (1993) Science 260: 926-932; и Morgan RA & Anderson WF (1993) Ann Rev Biochem 62: 191-217; Nabel GJ & Felgner PL (1993) Trends Biotechnol 11(5): 211-5); и *hygro*, который придает устойчивость к гигромицину (Santerre RF *et al.*, (1984) Gene 30(1-3): 147-56), при этом все вышеупомянутые источники включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Для отбора требуемого рекомбинантного клона традиционно можно применять способы, широко известные в области технологии рекомбинантных ДНК, и такие способы описаны, например, в Ausubel FM *et al.*, (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler M, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); и в главах 12 и 13 Dracopoli NC *et al.*, (eds.), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colbère-Garapin F *et al.*, (1981) J Mol Biol 150: 1-14, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00222] Уровни экспрессии молекулы антитела можно увеличить путем векторной амплификации (обзор см. в Bebbington CR & Hentschel CCG, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3 (Academic Press, New York, 1987), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Когда маркер в векторной системе является амплифицируемым, увеличение уровня ингибитора, присутствующего в культуре клетки-хозяина, будет увеличивать число копий маркерного гена. Поскольку амплифицированная область ассоциирована с представляющим интерес геном, продуцирование белка также будет увеличиваться (Crouse GF *et al.*, (1983) Mol Cell Biol 3: 257-66, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

[00223] Клетку-хозяина можно совместно трансфицировать двумя или более векторами экспрессии, описанными в данном документе, при этом первый вектор кодирует полипептид, полученный из тяжелой цепи, а второй вектор, кодирует полипептид, полученный из легкой цепи. Два вектора могут содержать идентичные селективируемые маркеры, которые обеспечивают равную экспрессию полипептидов тяжелой и легкой цепей. Клетки-хозяева можно совместно трансфицировать различными количествами двух или более векторов экспрессии. Например, клетки-хозяева можно трансфицировать при любом из следующих соотношений первого вектора экспрессии и второго вектора экспрессии: приблизительно 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10,

1:12, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45 или 1:50.

[00224] В качестве альтернативы можно применять один вектор, который кодирует и способен экспрессировать полипептиды как тяжелой, так и легкой цепи. В таких ситуациях легкая цепь должна быть помещена перед тяжелой цепью, чтобы избежать образование избытка токсичной свободной тяжелой цепи (Proudfoot NJ (1986) Nature 322: 562-565; и Köhler G (1980) PNAS 77: 2197-2199, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Кодирующие последовательности для тяжелой и легкой цепей могут содержать кДНК или геномную ДНК. Вектор экспрессии может быть моноцистронным или полицистронным. Полицистронная конструкция нуклеиновой кислоты может кодировать 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более генов/нуклеотидных последовательностей или в диапазоне 2-5, 5-10 или 10-20 генов/нуклеотидных последовательностей. Например, бицистронная конструкция нуклеиновой кислоты может содержать в следующем порядке: промотор, первый ген (например, тяжелую цепь описанного в данном документе антитела), второй ген (например, легкую цепь описанного в данном документе антитела). В таком векторе экспрессии транскрипция обоих генов может управляться промотором, тогда как трансляция мРНК первого гена может осуществляться с помощью кэп-зависимого механизма сканирования, а трансляция мРНК второго гена может осуществляться с помощью кэп-независимого механизма, например, с помощью IRES.

[00225] После того как описанная в данном документе молекула антитела была получена путем рекомбинантной экспрессии, ее можно очистить любым способом, известным в данной области техники для очистки молекулы иммуноглобулина, например, с помощью хроматографии (например, ионообменной, аффинной, в частности, по аффинности к конкретному антигену после белка А, и эксклюзионной колоночной хроматографии), центрифугирования, методики дифференциальной растворимости или любой другой стандартной методики очистки белков. Кроме того, для облегчения очистки описанные в данном документе антитела можно слить с гетерологичными полипептидными последовательностями, описанными в данном документе или иным образом известными в данной области техники.

[00226] В конкретных вариантах осуществления антитело, описанное в данном документе, является выделенным или очищенным. В определенных вариантах осуществления выделенное антитело представляет собой такое антитело, которое по сути не содержит других антител с антигенной специфичностью, отличной от специфичности выделенного антитела. Например, в определенных вариантах осуществления препарат на основе описанного в данном документе антитела по сути не содержит клеточного материала и/или химических предшественников. Формулировка «по сути не содержит клеточного материала» включает препараты антитела, в которых антитело отделено от клеточных компонентов клеток, из которых оно выделено или в которых получено рекомбинантным путем. Таким образом, антитело, которое по сути не содержит клеточного материала, включает препараты антитела, содержащие менее приблизительно

30%, 20%, 10%, 5%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% (по сухому весу) гетерологического белка (также называемого в данном документе «загрязняющим белком») и/или вариантов антитела, например, разных подвергнутых посттрансляционной модификации форм антитела или других разных версий антитела (например, фрагментов антител). При рекомбинантном получении антитела оно также, как правило, по сути не содержит культуральной среды, т. е. культуральная среда составляет менее приблизительно 20%, 10%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% объема белкового препарата. При получении антитела путем химического синтеза оно обычно по сути не содержит химических предшественников или других химических веществ, т. е. оно отделено от химических предшественников или других химических веществ, которые участвуют в синтезе белка. Соответственно, такие препараты антитела имеют менее приблизительно 30%, 20%, 10% или 5% (по сухому весу) химических предшественников или соединений, отличных от представляющего интерес антитела. В конкретном варианте осуществления описанные в данном документе антитела являются выделенными или очищенными.

[00227] Антитела к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) или его фрагменты можно получить посредством любого способа, известного в данной области техники для синтеза белков или антител, например, путем химического синтеза или методик рекомбинантной экспрессии. В описанных в данном документе способах используют, если не указано иное, традиционные методики молекулярной биологии, микробиологии, генетического анализа, рекомбинантной ДНК, органической химии, биохимии, ПЦР, синтеза и модификации олигонуклеотидов, гибридизации нуклеиновых кислот и смежных областей в пределах компетенции в данной области техники. Данные методики описаны, например, в упомянутых в данном документе источниках и полностью объяснены в литературе. См., например, Maniatis T *et al.*, (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J *et al.*, (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J *et al.*, (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel FM *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1987 и ежегодные дополнения); *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons (1987 и ежегодные дополнения); Gait (ed.) (1984) *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; Eckstein (ed.) (1991) *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, IRL Press; Birren B *et al.*, (eds.) (1999) *Genome Analysis: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00228] В конкретном варианте осуществления описанное в данном документе антитело получают, экспрессируют, создают или выделяют любыми способами, которые включают создание, например, путем синтеза, генной инженерии последовательностей ДНК. В определенных вариантах осуществления такое антитело содержит последовательности (например, последовательности ДНК или аминокислотные последовательности), которые не существуют в природе в пределах репертуара антител

зародышевого типа у животного или млекопитающего (например, человека) в условиях *in vivo*.

[00229] В одном аспекте в данном документе предусмотрен способ получения антитела к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), включающий культивирование описанной в данном документе клетки или клетки-хозяина. В определенных вариантах осуществления способ осуществляют в условиях *in vitro*. В определенном аспекте в данном документе предусмотрен способ получения антитела к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), включающий осуществление экспрессии (например, рекомбинантной экспрессии) антитела с применением описанной в данном документе клетки или клетки-хозяина (например, клетки или клетки-хозяина, содержащей полинуклеотиды, кодирующие описанное в данном документе антитело). В определенных вариантах осуществления клетка является выделенной клеткой. В определенных вариантах осуществления в клетку были введены экзогенные полинуклеотиды. В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает стадию очистки антитела, полученного из клетки или клетки-хозяина.

[00230] В определенных вариантах осуществления выделенное антитело получают путем экспрессии в клетке полинуклеотида, кодирующего VH и VL описанного в данном документе антитела, в подходящих условиях, так что экспрессируются полинуклеотиды и продуцируется антитело. В другом варианте осуществления выделенное антитело получают путем экспрессии в клетке полинуклеотида, кодирующего тяжелую цепь и легкую цепь описанного в данном документе антитела, в подходящих условиях, так что экспрессируются полинуклеотиды и продуцируется антитело. В определенных вариантах осуществления выделенное антитело получают путем экспрессии в клетке первого полинуклеотида, кодирующего VH описанного в данном документе антитела, и второго полинуклеотида, кодирующего VL описанного в данном документе антитела, в подходящих условиях, так что экспрессируются полинуклеотиды и продуцируется антитело. В определенных вариантах осуществления выделенное антитело получают путем экспрессии в клетке первого полинуклеотида, кодирующего тяжелую цепь описанного в данном документе антитела, и второго полинуклеотида, кодирующего легкую цепь описанного в данном документе антитела, в подходящих условиях, так что экспрессируются полинуклеотиды и продуцируется антитело.

[00231] Способы получения поликлональных антител известны в данной области техники (см., например, главу 11 в *Short Protocols in Molecular Biology*, (2002) 5th Ed., Ausubel FM *et al.*, eds., John Wiley and Sons, New York, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

[00232] Моноклональные антитела можно получить с применением широкого спектра методик, известных в данной области техники, включая применение гибридомных, рекомбинантных технологий и технологий фагового дисплея или их комбинации. Например, моноклональные антитела можно получить с применением

гибридомных методик, в том числе известных в данной области техники и описанных, например, в Harlow E & Lane D, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling GJ *et al.*, в *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981), каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Применяемый в данном документе термин «моноклональное антитело» не ограничивается антителами, полученными с помощью гибридомной технологии. Например, моноклональные антитела можно получить рекомбинантным способом из клеток-хозяев, экзогенным образом экспрессирующих описанное в данном документе антитело или его фрагмент, например, легкую цепь и/или тяжелую цепь такого антитела.

[00233] В конкретных вариантах осуществления применяемый в данном документе термин «моноклональное антитело» обозначает антитело, продуцируемое одной клеткой (например, гибридомой или клеткой-хозяином, продуцирующей рекомбинантное антитело), где антитело специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), как определено, например, с помощью ELISA или другого анализа связывания антигена или конкурентного связывания, известного в данной области техники или описанного в представленных в данном документе примерах. В определенных вариантах осуществления моноклональное антитело может быть химерным антителом или гуманизированным антителом. В определенных вариантах осуществления моноклональное антитело представляет собой моновалентное антитело или поливалентное (например, бивалентное) антитело. В определенных вариантах осуществления моноклональное антитело представляет собой моносpezifическое или полиspezifическое антитело (например, бисpezifическое антитело). Описанные в данном документе моноклональные антитела можно получить, например, с помощью гибридомного способа, который описан у Kohler G & Milstein C (1975) *Nature* 256: 495, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, или можно, например, выделить из фаговой библиотеки с помощью, например, описанных в данном документе методик. Другие способы получения клональных линий клеток и экспрессируемых ими моноклональных антител хорошо известны из уровня техники (см., например, главу 11 в: *Short Protocols in Molecular Biology*, (2002) 5th Ed., Ausubel FM *et al.*, *выше*).

[00234] Применяемое в данном документе антитело связывается с антигеном поливалентным образом (например, бивалентным образом), когда антитело содержит по меньшей мере две (например, две или более) моновалентные связывающие области, причем каждая моновалентная связывающая область способна связываться с эпитопом на антигене. Каждая моновалентная связывающая область может связываться с одним и тем же или разными эпитопами на антигене.

[00235] Способы получения и скрининга специфических антител с применением гибридомной технологии являются традиционными и хорошо известны в данной области техники. Например, в гибридомном способе мышь или другое подходящее животное-

хозяина, такое как овца, коза, кролик, крыса, хомяк или макак, иммунизируют для выработки лимфоцитов, которые продуцируют или способны продуцировать антитела, которые будут специфически связываться с белком (например, TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)), применяемым для иммунизации. В качестве альтернативы лимфоциты можно иммунизировать в условиях *in vitro*. Затем лимфоциты сливают с клетками миеломы с применением подходящего средства для слияния, такого как полиэтиленгликоль, с образованием гибридомной клетки (Goding JW (ed.), *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Кроме того, для иммунизации животного можно применять методику RIMMS (повторная иммунизация в несколько участков) (Kilpatrick KE *et al.*, (1997) *Hybridoma* 16:381-9, включенная в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

[00236] В определенных вариантах осуществления мышей (или других животных, таких как крысы, обезьяны, ослы, свиньи, овцы, хомяки или собаки) могут иммунизировать антигеном (например, TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)), а после выявления иммунного ответа, например, выявления специфических к антигену антител в мышинной сыворотке крови, собирают мышиную селезенку и выделяют спленциты. Затем спленциты сливают с помощью хорошо известных методик с любыми подходящими клетками миеломы, например клетками из линии клеток SP20, доступными из Американской коллекции типовых культур (ATCC[®]) (Манассас, Вирджиния, США), с получением гибридом. Гибридомы отбирают и клонируют путем предельного разведения. В определенных вариантах осуществления собирают лимфатические узлы иммунизированных мышей и сливают их с клетками миеломы NS0.

[00237] Полученные таким образом гибридомные клетки высевают и выращивают в подходящей культуральной среде, которая предпочтительно содержит одно или более веществ, подавляющих рост или выживание неслитых исходных клеток миеломы. Например, если в исходных клетках миеломы отсутствует фермент гипоксантингуанинфосфорибозилтрансфераза (HGPRT или HPRT), культуральная среда для гибридом обычно будет включать гипоксантин, аминоптерин и тимидин (среда HAT), такие вещества предотвращают рост HGPRT-дефицитных клеток.

[00238] В конкретных вариантах осуществления используют клетки миеломы, которые эффективно сливаются, поддерживают стабильное продуцирование антител на высоком уровне выбранными клетками, продуцирующими антитела, и чувствительны к такой среде, как среда HAT. К данным линиям клеток миеломы относятся линии мышинной миеломы, такие как линия клеток NS0 или линии, полученные из мышинных опухолей MOPC-21 и MPC-11, доступные в Центре распространения клеток Института Солка, Сан-Диего, Калифорния, США, и SP-2 или клетки X63-Ag8.653, доступные в Американской коллекции типовых культур, Роквилл, Мэриленд, США. Также были описаны линии клеток миеломы человека и мышино-человеческой гетеромиеломы для

продуцирования человеческих моноклональных антител (Kozbor D (1984) J Immunol 133: 3001-5; Brodeur *et al.*, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987), каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

[00239] Культуральную среду, в которой растут гибридные клетки, анализируют в отношении продуцирования моноклональных антител, направленных против TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака). Специфичность связывания моноклональных антител, продуцируемых гибридными клетками, определяют с помощью способов, известных в данной области техники, например, иммунопреципитации или анализа связывания *in vitro*, такого как радиоиммунный анализ (RIA) или твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA).

[00240] После идентификации гибридных клеток, которые продуцируют антитела с требуемой специфичностью, аффинностью и/или активностью, клоны можно подвергнуть субклонированию с помощью процедур предельных разведений и вырастить стандартными способами (Goding JW (ed.), Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, *выше*). Питательные среды, подходящие для такой цели, включают, например, среду D-MEM или RPMI 1640. Кроме того, гибридные клетки можно выращивать в условиях *in vivo* в виде асцитных опухолей у животного.

[00241] Секретируемые субклонами моноклональные антитела подходящим образом отделяют от культуральной среды, асцитной жидкости или сыворотки крови с помощью традиционных процедур очистки иммуноглобулина, таких как, например, применение сефарозы с белком А, хроматография на гидроксилпатите, гель-электрофорез, диализ или аффинная хроматография.

[00242] Описанные в данном документе антитела включают, например, фрагменты антител, которые распознают TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) и которые можно получить с помощью любой методики, известной специалистам в данной области техники. Например, описанные в данном документе Fab- и F(ab')₂-фрагменты можно получить с помощью протеолитического расщепления молекул иммуноглобулина с применением таких ферментов, как папаин (для получения Fab-фрагментов) или пепсин (для получения F(ab')₂-фрагментов). Fab-фрагмент соответствует одному из двух идентичных плеч молекулы антитела и содержит полную легкую цепь, спаренную с доменами VH и CH1 тяжелой цепи. F(ab')₂-фрагмент содержит два антигенсвязывающих плеча молекулы антитела, связанные дисульфидными связями в шарнирной области.

[00243] Кроме того, описанные в данном документе антитела также можно получить с применением различных способов фагового дисплея, известных из уровня техники. В способах фагового дисплея функциональные домены антител экспонируются на поверхности фаговых частиц, которые несут полинуклеотидные последовательности, кодирующие их. В частности, последовательности ДНК, кодирующие домены VH и VL, амплифицируют из библиотек кДНК животного (например, библиотек человеческих или

мышинных кДНК пораженных тканей). ДНК, кодирующую домены VH и VL, рекомбинируют вместе с линкером scFv с помощью ПЦР и клонируют в фагмидный вектор. Вектор посредством электропорации вводят в *E. coli* и инфицируют *E. coli* вспомогательным фагом. Фаг, применяемый в данных способах, как правило, представляет собой нитевидный фаг, в том числе fd и M13, а домены VH и VL обычно рекомбинантно сливают с одним из гена III или гена VIII фага. Фаг, экспрессирующий антигенсвязывающую область, которая связывается с конкретным антигеном, можно отобрать или идентифицировать с помощью антигена, например, с применением меченого антигена или антигена, связанного с твердой поверхностью или гранулой или захваченного на них. Примеры способов фагового дисплея, которые можно применять для получения описанных в данном документе антител, включают способы, раскрытые в Brinkman U *et al.*, (1995) *J Immunol Methods* 182: 41-50; Ames RS *et al.*, (1995) *J Immunol Methods* 184: 177-186; Kettleborough CA *et al.*, (1994) *Eur J Immunol* 24: 952-958; Persic L *et al.*, (1997) *Gene* 187: 9-18; Burton DR & Barbas CF (1994) *Advan Immunol* 57: 191-280; заявке согласно РСТ № РСТ/GB91/001134; международных публикациях №№ WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/1 1236, WO 95/15982, WO 95/20401 и WO 97/13844; и патентах США №№ 5698426, 5223409, 5403484, 5580717, 5427908, 5750753, 5821047, 5571698, 5427908, 5516637, 5780225, 5658727, 5733743 и 5969108, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00244] Как описано в приведенных выше литературных источниках, после фаговой селекции кодирующие области для антитела можно выделить из фага и применять для получения полноразмерных антител, в том числе человеческих антител, или любого другого требуемого антигенсвязывающего фрагмента, и экспрессировать в любом требуемом хозяине, в том числе клетках млекопитающих, клетках насекомых, клетках растений, дрожжах и бактериях, например, как описано ниже. Методики рекомбинантного получения фрагментов антител, таких как Fab-, Fab'- и F(ab')₂-фрагменты, также можно использовать с применением способов, известных в данной области техники, таких как раскрытые в публикации согласно РСТ № WO 92/22324; Mullinax RL *et al.*, (1992) *BioTechniques* 12(6): 864-9; Sawai H *et al.*, (1995) *Am J Reprod Immunol* 34: 26-34; и Better M *et al.*, (1988) *Science* 240: 1041-1043, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00245] В определенных вариантах осуществления для получения полноразмерных антител ПЦР-праймеры, включающие нуклеотидные последовательности VH или VL, сайт рестрикции и фланкирующую последовательность для защиты сайта рестрикции, можно применять для амплификации последовательностей VH или VL с матрицы, например, клонов scFv. Используя методики клонирования, известные специалистам в данной области техники, домены VH, амплифицированные с помощью ПЦР, можно клонировать в векторы, экспрессирующие константную область VH, а домены VL, амплифицированные с помощью ПЦР, можно клонировать в векторы, экспрессирующие

константную область VL, например, человечески константные области каппа- или лямбда-цепи. Домены VH и VL также можно клонировать в один вектор, экспрессирующий необходимые константные области. Затем с применением методик, известных специалистам в данной области техники, векторы конверсии тяжелой цепи и векторы конверсии легкой цепи совместно трансфицируют в линии клеток с получением стабильных или временных линий клеток, которые экспрессируют полноразмерные антитела, например IgG.

[00246] Химерное антитело представляет собой молекулу, в которой разные части антитела получены из разных молекул иммуноглобулина. Например, химерное антитело может содержать вариабельную область мышиноного или крысиного моноклонального антитела, слитую с константной областью человеческого антитела. Способы получения химерных антител известны из уровня техники. См., например, Morrison SL (1985) *Science* 229: 1202-7; Oi VT & Morrison SL (1986) *BioTechniques* 4: 214-221; Gillies SD *et al.*, (1989) *J Immunol Methods* 125: 191-202; и патенты США №№ 5807715, 4816567, 4816397 и 6331415, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00247] Гуманизированное антитело способно связываться с заранее заданным антигеном и содержит каркасную область, имеющую по сути аминокислотную последовательность человеческого иммуноглобулина, и CDR, имеющие по сути аминокислотную последовательность отличного от человеческого иммуноглобулина (например, мышиноного иммуноглобулина). В определенных вариантах осуществления гуманизированное антитело также содержит по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), как правило, человеческого иммуноглобулина. Антитело также может включать CH1, шарнирную, CH2, CH3 и CH4 области тяжелой цепи. Гуманизированное антитело может быть выбрано из любого класса иммуноглобулинов, включая IgM, IgG, IgD, IgA и IgE, и любого изотипа, в том числе IgG₁, IgG₂, IgG₃ и IgG₄. Гуманизированные антитела можно получить с применением различных методик, известных в данной области техники, включая без ограничения прививание CDR (европейский патент № EP 239400; международная публикация № WO 91/09967 и патенты США №№ 5225539, 5530101 и 5585089), вивинирование или изменение поверхности (европейские патенты №№ EP 592106 и EP 519596; Padlan EA (1991) *Mol Immunol* 28(4/5): 489-498; Studnicka GM *et al.*, (1994) *Prot Engineering* 7(6): 805-814; и Roguska MA *et al.*, (1994) *PNAS* 91: 969-973), перетасовку цепей (патент США № 5565332) и методики, раскрытые, например, в патенте США № 6407213, патенте США № 5766886, международной публикации № WO 93/17105; Tan P *et al.*, (2002) *J Immunol* 169: 1119-25; Caldas C *et al.*, (2000) *Protein Eng.* 13(5): 353-60; Morea V *et al.*, (2000) *Methods* 20(3): 267-79; Vaca M *et al.*, (1997) *J Biol Chem* 272(16): 10678-84; Roguska MA *et al.*, (1996) *Protein Eng* 9(10): 895-904; Couto JR *et al.*, (1995) *Cancer Res.* 55 (23 Supp): 5973s-5977s; Couto JR *et al.*, (1995) *Cancer Res* 55(8): 1717-22; Sandhu JS (1994) *Gene* 150(2): 409-10; и Pedersen JT *et al.*, (1994) *J Mol Biol* 235(3): 959-73, все из которых включены в данный документ

посредством ссылки во всей своей полноте. См. также публикацию заявки на патент США № US 2005/0042664 A1 (24 февраля 2005 г.), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00248] Были описаны способы получения полиспецифических антител (например, биспецифических антител), см., например, патенты США №№ 7951917; 7183076; 8227577; 5837242; 5989830; 5869620; 6132992 и 8586713, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00249] Биспецифические, бивалентные антитела и способы их получения описаны, например, в патентах США №№ 5731168; 5807706; 5821333 и публикациях заявок на патент США №№ 2003/020734 и 2002/0155537, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Биспецифические тетравалентные антитела и способы их получения описаны, например, в публикациях международных заявок №№ WO02/096948 и WO00/44788, раскрытия обеих из них включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. См. в целом публикации международных заявок №№ WO93/17715, WO92/08802, WO91/00360 и WO92/05793; Tutt *et al.*, J. Immunol. 147:60-69 (1991); патенты США №№ 4474893; 4714681; 4925648; 5573920 и 5601819; и Kostelny *et al.*, J. Immunol. 148:1547-1553 (1992), все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00250] Биспецифическое антитело, описанное в данном документе, можно получить в соответствии с технологической платформой DuoBody (Genmab A/S), как описано, например, в международных публикациях №№ WO 2011/131746, WO 2011/147986, WO 2008/119353 и WO 2013/060867, и у Labrijn AF *et al.*, (2013) PNAS 110(13): 5145-5150. Технологию DuoBody можно применять для объединения половины первого моноспецифического антитела или первой антигенсвязывающей области, содержащей две тяжелые и две легкие цепи, с половиной второго моноспецифического антитела или второй антигенсвязывающей области, содержащей две тяжелые и две легкие цепи. Полученный гетеродимер содержит одну тяжелую цепь и одну легкую цепь из первого антитела или первой антигенсвязывающей области, образующие пару с одной тяжелой цепью и одной легкой цепью из второго антитела или второй антигенсвязывающей области. Если оба моноспецифических антитела или антигенсвязывающие области распознают разные эпитопы на разных антигенах, полученный гетеродимер представляет собой биспецифическое антитело.

[00251] Для технологии DuoBody требуется, чтобы каждое из моноспецифических антител или антигенсвязывающих областей включало константную область тяжелой цепи с единственной точечной мутацией в домене СН3. Точечные мутации обеспечивают более сильное взаимодействие между доменами СН3 в полученном биспецифическом антителе, чем между доменами СН3 в любом из моноспецифических антител или антигенсвязывающих областей. Единственная точечная мутация в каждом моноспецифическом антителе или антигенсвязывающей области находится в остатке 366, 368, 370, 399, 405, 407 или 409, пронумерованном в соответствии с системой нумерации

ЕС, в домене СНЗ константной области тяжелой цепи, как описано, например, в международной публикации № WO 2011/131746. Более того, единственная точечная мутация расположена в отличающемся остатке одного моноспецифического антитела или антигенсвязывающей области по сравнению с другим моноспецифическим антителом или антигенсвязывающей областью. Например, одно моноспецифическое антитело или антигенсвязывающая область могут содержать мутацию F405L (т. е. мутацию фенилаланина в лейцин в остатке 405), тогда как другое моноспецифическое антитело или антигенсвязывающая область могут содержать мутацию K409R (т. е. мутацию лизина в аргинин в остатке 409), пронумерованные в соответствии с системой нумерации EU. Константные области тяжелой цепи моноспецифических антител или антигенсвязывающих областей могут принадлежать к изотипу IgG₁, IgG₂, IgG₃ или IgG₄ (например, изотипу IgG₁ человека), а биспецифическое антитело, полученное с помощью технологии DuoBody, может сохранять Fc-опосредованные эффекторные функции.

[00252] Другой способ получения биспецифических антител был назван стратегией «выступы-во-впадины» (см., например, международную публикацию WO2006/028936). В этой технологии количество ошибочных спариваний тяжелых цепей Ig снижается за счет мутации выбранных аминокислот, образующих поверхность контакта доменов СНЗ в IgG. В положениях в пределах домена СНЗ, по которым две тяжелые цепи непосредственно взаимодействуют, аминокислоту с небольшой боковой цепью (впадина) вводят в последовательность одной тяжелой цепи, а аминокислоту с большой боковой цепью (выступ) вводят в соответствующее местоположение взаимодействующего остатка на другой тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению содержат цепи иммуноглобулина, в которых домены СНЗ были модифицированы путем мутации выбранных аминокислот, которые взаимодействуют на поверхности контакта между двумя полипептидами, так что преимущественно образуется биспецифическое антитело. Биспецифические антитела могут быть составлены из цепей иммуноглобулина одного и того же подкласса (например, IgG₁ или IgG₃) или разных подклассов (например, IgG₁ и IgG₃ или IgG₃ и IgG₄).

[00253] В некоторых случаях биспецифические антитела могут содержать гетеродимеры цепей IgG₄ и IgG₁, IgG₄ и IgG₂, IgG₄ и IgG₂, IgG₄ и IgG₃ или IgG₁ и IgG₃. Такие антитела с гетеродимерными тяжелыми цепями традиционно можно конструировать, например, путем модификации выбранных аминокислот, образующих поверхность контакта доменов СНЗ в IgG₄ и IgG₁ или IgG₃ человека, так что оказывается предпочтение образованию гетеродимерной тяжелой цепи.

[00254] В определенных вариантах осуществления описанное в данном документе антитело, которое связывается с тем же самым эпитопом TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), что и описанное в данном документе антитело к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), является человеческим антителом. В определенных вариантах осуществления описанное в данном документе антитело, которое конкурентно блокирует (например, дозозависимым образом) любое из

описанных в данном документе антител от связывания с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), является человеческим антителом. Человеческие антитела можно получить любым способом, известным из уровня техники. Например, можно применять трансгенных мышей, которые не способны экспрессировать функциональные эндогенные иммуноглобулины, но которые могут экспрессировать гены человеческих иммуноглобулинов. В частности, в эмбриональные стволовые клетки мыши можно ввести случайным образом или путем гомологичной рекомбинации комплексы генов тяжелой и легкой цепей человеческого иммуноглобулина. В качестве альтернативы в дополнение к генам человеческих тяжелой и легкой цепей в эмбриональные стволовые клетки мыши можно ввести человеческую варибельную область, константную область и область, отвечающую за разнообразие. Гены мышинных тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина можно сделать нефункциональными по отдельности или одновременно с введением локусов человеческого иммуноглобулина путем гомологичной рекомбинации. В частности, продуцирование эндогенных антител предотвращает гомозиготная делеция области J_H. Модифицированные эмбриональные стволовые клетки размножают и вводят посредством микроинъекции в бластоцисты с получением химерных мышей. Затем химерных мышей скрещивают для получения гомозиготного потомства, экспрессирующего человеческие антитела. Трансгенных мышей иммунизируют обычным образом выбранным антигеном, например, всем или частью антигена (например, TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)). Моноклональные антитела, направленные против антигена, можно получить от иммунизированных трансгенных мышей с применением традиционной гибридомной технологии. Трансгены человеческого иммуноглобулина, содержащиеся в трансгенных мышях, перестраиваются во время дифференцировки В-клеток и впоследствии подвергаются переключению классов и соматической мутации. Таким образом, с применением данной методики можно получать терапевтически применимые антитела IgG, IgA, IgM и IgE. Обзор данной технологии получения человеческих антител см. в Lonberg N & Huszar D (1995) *Int Rev Immunol* 13:65-93, включенной в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Подробное обсуждение данной технологии получения человеческих антител и человеческих моноклональных антител и протоколов получения таких антител см., например, в международных публикациях №№ WO 98/24893, WO 96/34096 и WO 96/33735; и патентах США №№ 5413923, 5625126, 5633425, 5569825, 5661016, 5545806, 5814318 и 5939598, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Примеры мышей, способных продуцировать человеческие антитела, включают XenomouseTM (Abgenix, Inc.; патенты США №№ 6075181 и 6150184), HuAb-MouseTM (Medarex, Inc./Gen Pharm; патенты США №№ 5545806 и 5569825), Trans Chromo MouseTM (Kirin) и KM MouseTM (Medarex/Kirin), все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00255] Человеческие антитела, которые специфически связываются с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), можно получить различными

способами, известными в данной области техники, включая описанные выше способы фагового дисплея с применением библиотек антител, полученных из последовательностей человеческих иммуноглобулинов. См. также патенты США №№ 4444887, 4716111 и 5885793; и международные публикации №№ WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 и WO 91/10741, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00256] В определенных вариантах осуществления человеческие антитела можно получить с применением гибридомы мыши и человека. Например, человеческие лимфоциты периферической крови, трансформированные вирусом Эпштейна-Барр (EBV), можно слить с клетками мышиной миеломы с получением гибридомы мыши и человека, секретирующей моноклональные антитела человека, и данные гибридомы мыши и человека можно подвергнуть скринингу для определения тех гибридом, которые секретируют человеческие моноклональные антитела, которые специфически связываются с целевым антигеном (например, TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)). Такие способы известны и описаны в уровне техники, см., например, Shinmoto H *et al.*, (2004) *Cytotechnology* 46: 19-23; Naganawa Y *et al.*, (2005) *Human Antibodies* 14: 27-31, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

7.6 Наборы

[00257] Также предусмотрены наборы, содержащие одно или более описанных в данном документе антител или фармацевтические композиции или их конъюгаты на их основе. В конкретном варианте осуществления в данном документе предусмотрена фармацевтическая упаковка или набор, которые содержат один или более контейнеров, заполненных одним или более ингредиентами описанных в данном документе фармацевтических композиций, такими как одно или более антител, предусмотренных в данном документе. В определенных вариантах осуществления наборы содержат описываемую в данном документе фармацевтическую композицию и любое профилактическое или терапевтическое средство, такое как описанные в данном документе. В определенных вариантах осуществления наборы могут содержать митоген для Т-клеток, такой как, например, фитогемагглютинин (PHA) и/или форболмиристатацетат (PMA), или антитело, стимулирующее комплекс TCR, такое как антитело к CD3 и антитело к CD28. Необязательно с таким(-ими) контейнером(-ами) может быть ассоциировано уведомление в форме, предписанной государственным органом, регулирующим изготовление, применение или продажу фармацевтических препаратов или биологических продуктов, в котором отражено выданное органом разрешение на изготовление, применение или продажу для применения на людях.

[00258] Также предусмотрены наборы, которые можно применять в вышеуказанных способах. В определенных вариантах осуществления набор содержит описанное в данном документе антитело, предпочтительно очищенное антитело, в одном или более контейнерах. В конкретном варианте осуществления описанные в данном

документе наборы содержат по сути выделенный антиген TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) в качестве контроля. В другом конкретном варианте осуществления описанные в данном документе наборы дополнительно содержат контрольное антитело, которое реагирует на антиген TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака). В другом конкретном варианте осуществления описанные в данном документе наборы содержат один или более элементов для выявления связывания антитела с антигеном TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) (например, антитело может быть конъюгировано с выявляемым субстратом, таким как флуоресцентное соединение, ферментативный субстрат, радиоактивное соединение или люминесцентное соединение, или второе антитело, которое распознает первое антитело, может быть конъюгировано с выявляемым субстратом). В конкретных вариантах осуществления предусмотренный в данном документе набор может включать полученный рекомбинантным путем или синтезированный химически антиген TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака). Представленный в наборе антиген TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) также может быть присоединен к твердой подложке. В более конкретном варианте осуществления средства выявления из описанного выше набора включают твердую подложку, к которой присоединен антиген TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака). Такой набор также может включать неприсоединенное, меченное репортерной меткой антитело к человеческим антителам или антитело к антителам мыши/крысы. В данном варианте осуществления связывание антитела с антигеном TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) можно выявлять с помощью связывания указанного меченого репортерной меткой антитела. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению набора по настоящему изобретению для анализа *in vitro* и/или выявления антигена TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) в биологическом образце.

8. ПРИМЕРЫ

[00259] Примеры в данном разделе (т. е. в разделе 8) предложены в качестве иллюстрации, а не в качестве ограничения.

8.1 Пример 1. Зарядовое состояние BA159 и эталонного антитела к TIGIT

[00260] Зарядовые состояния BA159 и эталонного антитела к TIGIT оценивали с применением катионообменной хроматографии.

[00261] Вкратце, для отделения каждого антитела на основе его поверхностного заряда использовали систему для HPLC Agilent 1260 и колонку Propac WCX-10 (Thermo). Каждое антитело разводили до концентрации 1,0 мг/мл в растворе, содержащем 10 мМ гистидина, pH 6, и 115 мМ NaCl. Затем 10 мкл вводили в колонку Propac WCX-10 (Thermo), уравновешенную 20 мМ цитрата натрия, pH 5,5. Градиентное элюирование проводили при скорости 1 мл/мин на протяжении 20 минут в растворе, содержащем 20 мМ цитрата натрия, pH 6,0, и 250 мМ NaCl. Элюированные из колонки молекулы выявляли по поглощению при 280 нм.

[00262] Как показано на фиг. 1А и 1В, ВА159 элюируется при более высокой ионной силе (17,1 мин), чем эталонное антитело к TIGIT (11,9 мин), что указывает на то, что ВА159 характеризуется более высоким зарядовым состоянием при рН 5,5-6,0 и является менее кислотным, чем эталонное антитело к TIGIT.

8.2 Пример 2. Термостабильность ВА159 и эталонного антитела к TIGIT

[00263] Термостабильность ВА159 и эталонного антитела к TIGIT оценивали с применением термического плавления.

[00264] Вкратце, платформу для оценки стабильности белка Uncle от Unchained Labs использовали для повышения температуры образца, а затем измеряли собственную флуоресценцию и агрегацию. Каждое антитело разводили до концентрации 1,0 мг/мл в растворе, содержащем 10 мМ гистидина, рН 6, и 115 мМ NaCl. Затем образцы центрифугировали при 13000 об/мин в течение 10 минут для удаления частиц пыли или очень крупных агрегатов. 9,0 мкл разведенного антитела загружали в двух повторностях в модуль Uni, который помещали в Uncle, и запускали протокол термического плавления «Tm & Tagg с необязательным DLS». Температуру образца повышали от 20 до 90°C со скоростью 1°C/мин, при этом образец освещали лазером с длиной волны 266 нм и измеряли собственную флуоресценцию образца, чтобы отслеживать его разворачивание. Данные флуоресценции анализировали с применением барицентрического среднего (BCM). Образцы исследовали в двух повторностях и для каждого антитела рассчитывали среднюю температуру разворачивания (Tm). Статическое светорассеяние (SLS) лазера с длиной волны 266 нм образцом также измеряли под углом 90° к источнику света. Образцы исследовали в двух повторностях и для каждого антитела рассчитывали среднюю температуру агрегации (Tagg). Все расчеты проводили с применением программного обеспечения Uncle. Качество данных подтверждали с применением визуального осмотра.

[00265] Результаты, показанные на фиг. 2А, фиг. 2В и в таблице 3, демонстрируют, что как ВА159, так и эталонное антитело к TIGIT характеризуются двумя переходами разворачивания, и что второй переход разворачивания для эталонного антитела к TIGIT происходит при более низкой температуре, что указывает на то, что ВА159 является более термически стабильным, чем эталонное антитело к TIGIT. На фиг. 3А и фиг. 3В показано, что профили агрегации для ВА159 и эталонного антитела к TIGIT сопоставимы.

Таблица 3. Температуры разворачивания и агрегации ВА159 и эталонного антитела к TIGIT.

	ВА159	Эталонное антитело к TIGIT
Tm1 (°C)	50	50
Tm2 (°C)	77	71
Tagg (°C)	73	71

8.3 Пример 3. Профиль связывания с FcRn у ВА159 и эталонного антитела к TIGIT

[00266] Зависимость от рН для связывания антитела с рекомбинантной версией неонатального Fc-рецептора человека оценивали для ВА159 и эталонного антитела к

TIGIT с применением аффинной хроматографии.

[00267] Вкратце, систему для HPLC Agilent 1260 и колонку для аффинной хроматографии с FcRn (Roche) применяли для отделения BA159 и эталонного антитела к TIGIT на основе pH, при котором антитело элюирует от FcRn. Каждую молекулу разводили до концентрации 1,0 мг/мл в растворе, содержащем 10 mM гистидина, pH 6, и 115 mM NaCl, а затем 10 мкл вводили в колонку для аффинной хроматографии с FcRn (Roche), уравновешенную 20 mM MES, pH 5,5, и 140 mM NaCl. Градиентное элюирование проводили при скорости 0,1 мл/мин на протяжении 77 минут в 20 mM TRIS, pH 8,8, 140 mM NaCl. Молекулы, элюируемые из колонки, выявляли по поглощению при 280 нм. Качество данных подтверждали с применением хорошо изученного контрольного антитела IgG₁ и поликлональной смеси IgG из сыворотки крови человека (Sigma-Aldrich) в качестве контролей в анализе, а также с применением визуального осмотра.

[00268] Как показано на фиг. 4A-4D и в таблице 4, BA159 и эталонное антитело к TIGIT элюировались из колонки с подобным временем удерживания и pH, что и контрольное антитело IgG₁ и поликлональная смесь IgG.

Таблица 4. Время удерживания для BA159, эталонного антитела к TIGIT, контрольного mAb IgG₁ и поликлональной смеси IgG.

	BA159	Эталонное антитело к TIGIT	Контрольное mAb IgG₁	Поликлональная смесь IgG
Время удерживания (мин)	73	72	73	74

8.4 Пример 4. Образование межцепочечных дисульфидных связей в BA159 и BA160

[00269] Степень образования межцепочечных дисульфидных связей у BA159 и BA160 оценивали с применением CE SDS в невозстанавливающих условиях. BA159 и BA160 имеют одинаковые последовательности тяжелой и легкой цепей, за исключением того, что в легкой цепи BA160 отсутствует С-концевой серин.

[00270] Вкратце, для разворачивания антител использовали Lab Chip GTX II Touch HT от Perkin Elmer и набор для анализа белков Protein Express. Нековалентные взаимодействия разрушали с применением протокола, разработанного для исследования стабильности дисульфидной связи тяжелая цепь-легкая цепь, а затем для разделения молекул по размеру с применением разности потенциалов, приложенной к ситовой матрице.

[00271] Каждое антитело разводили до концентрации 0,1 мг/мл в буфере для образцов Protein Express, затем нагревали при 100°C в течение 5 минут. Каждый образец медленно вводили с помощью Lab Chip в микрофлюидный аппарат прибора, смешивали с раствором красителя Protein Express, а затем несколько мкл втягивали в разделительный канал с помощью приложенной разности потенциалов. После разделения образцы обесцвечивали с применением обесцвечивающего раствора, а разделенные молекулы

выявляли по флуоресценции красителя с применением лазера. Размер молекул определяли с применением лесенки, поставляемой с набором Protein Express. Качество данных подтверждали с применением параметров, определяемых с помощью Lab Chip, а также с помощью визуального осмотра.

[00272] Как показано на фиг. 5А и фиг. 5В, а также в таблице 5, для ВА160 характерно больше молекул с полностью сформированными дисульфидными связями тяжелая цепь-легкая цепь (LNHL), чем для ВА159.

Таблица 5. Образование межцепочечных дисульфидных связей в молекулах ВА159 и ВА160.

Цепи, связанные дисульфидными связями	Прибл. размер (кДа)	ВА159	ВА160
LNHL	176	43%	69%
NHL	154	8%	7%
NN	127	30%	7%
HL	98	3%	5%
N	62	8%	6%
L	38	9%	6%

8.5 Пример 5. Прочие биофизические свойства ВА159 и ВА160

8.5.1 Зарядовое состояние антител к TIGIT

[00273] Зарядовые состояния ВА159, ВА160 и эталонного антитела к TIGIT оценивали с применением катионообменной хроматографии. Следовали способам, описанным в примере 1.

[00274] Как показано на фиг. 6А и фиг. 6В, ВА159 (11,1 мин) и ВА160 (11,1 мин) элюируются при подобной ионной силе, что указывает на то, что оба антитела характеризуются сопоставимыми поверхностными зарядами.

8.5.2 Термостабильность антител к TIGIT

[00275] Термостабильность ВА159, ВА160 и эталонного антитела к TIGIT оценивали с применением термического плавления. Следовали способам, описанным в примере 2.

[00276] Как показано на фиг. 7А, фиг. 7В и в таблице 6, ВА159 и ВА160 характеризуются сопоставимыми профилями разворачивания с двумя переходами разворачивания. ВА159 и ВА160 также характеризуются сопоставимыми профилями агрегации, как показано на фиг. 8А и 8В соответственно.

Таблица 6. Температуры разворачивания и агрегации ВА159 и ВА160.

	ВА159	ВА160
T_{m1} (°C)	51	51
T_{m2} (°C)	80	80
Tagg (°C)	74	74

8.5.3 Профили эксклюзионной хроматографии антител к TIGIT

[00277] Размер и степень образования мономеров для BA159, BA160 и эталонного антитела к TIGIT оценивали с применением аналитической эксклюзионной хроматографии.

[00278] Вкратце, для разделения каждого антитела по размеру и для определения присутствия высокомолекулярных, низкомолекулярных и мономерных разновидностей использовали систему для HPLC Agilent 1260 и колонку TSKGel SuperSW mAb HR (Tosoh).

[00279] Каждое антитело разводили до концентрации 1,0 мг/мл в растворе, содержащем 10 мМ гистидина, pH 6, и 115 мМ NaCl, а затем 10 мкл вводили в колонку TSKGel SuperSW mAb HR (Tosoh), уравновешенную 50 мМ фосфата натрия, pH 6,7, и 150 мМ NaCl. Затем в колонку закачивали 50 мМ фосфата натрия, pH 6,7, и 150 мМ NaCl при скорости 0,8 мл/мин. Молекулы, элюируемые из колонки, выявляли по поглощению при 214 нм, а площадь под кривой использовали для количественной оценки каждого пика. Качество данных подтверждали с применением визуального осмотра.

[00280] Как показано на фиг. 9А, 9В и 9С, 99% BA159, BA160 и эталонного антитела к TIGIT элюировались при времени удерживания мономера (т. е. 10,8 минуты для BA159 и BA160 и 10,4 минуты для эталонного антитела к TIGIT соответственно).

8.5.4 Профили динамического светорассеяния антител к TIGIT человека

[00281] Присутствие высокомолекулярных разновидностей оценивали с применением динамического светорассеяния.

[00282] Вкратце, платформу для оценки стабильности белка Uncle от Unchained Labs использовали для измерения размера частиц в образце BA159, BA160 и эталонного антитела к TIGIT.

[00283] Каждое антитело разводили до концентрации 1 мг/мл в 1x PBS, pH 7,4 (11,9 мМ PO₄, 137 мМ NaCl, 2,7 KCl). Затем образцы центрифугировали при 13000 об/мин в течение 10 минут, чтобы удалить частицы пыли или очень крупные агрегаты. 9,0 мкл разведенного антитела загружали в двух повторностях в модуль Uni и исследовали в Uncle с применением протокола DLS «Определение размера и индекса полидисперсности». Рассеяние света частицами, движущимися через образец за счет броуновского движения, выявляли под углом 90° к источнику света. Коэффициент диффузии рассчитывали путем подгонки функции автокорреляции к одной экспоненте, затем уравнение Стокса-Эйнштейна и коэффициент диффузии применяли для расчета среднего гидродинамического диаметра гипотетической сферы образца. Также рассчитывали коэффициент полидисперсности (PDI), являющийся показателем монодисперсности образца. Образцы с PDI ниже 0,25 считались монодисперсными. Все расчеты проводили с применением программного обеспечения Uncle. Качество данных подтверждали с применением визуального осмотра.

[00284] Как показано на фиг. 10А-10С, каждый образец характеризовался гидродинамическим диаметром 10 нм, что составляет приблизительный размер мономерного антитела. Каждое антитело также составляло 100% образца в основном пике

мономера. При экспериментах в двух повторностях PDI составляли 0,189 и 0,151 для BA159, 0,198 и 0,233 для BA160 и 0,247 и 0,030 для эталонного антитела к TIGIT.

8.5.5 Профили хроматографии гидрофобного взаимодействия антител к TIGIT человека

[00285] Гидрофобность BA159, BA160 и эталонного антитела к TIGIT оценивали с применением хроматографии гидрофобного взаимодействия.

[00286] Вкратце, для разделения каждого антитела на основе поверхностной гидрофобности каждой молекулы использовали систему для HPLC Agilent 1260 и колонку TSKGel с бутил-NPR (Tosoh).

[00287] Каждое антитело разводили до концентрации 1,0 мг/мл в растворе, содержащем 10 мМ гистидина, pH 6, и 115 мМ NaCl, а затем 10 мкл вводили в колонку TSKGel с бутил-NPR (Tosoh), уравновешенную 25 мМ фосфата натрия, pH 7,0, и 1,5 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Градиентное элюирование проводили при скорости 1 мл/мин на протяжении 21 минуты в 25 мМ фосфата натрия, pH 7,0. Молекулы, элюируемые из колонки, выявляли по поглощению при 229 нм. Качество данных подтверждали с применением визуального осмотра.

[00288] Как показано на фиг. 11A-11C, BA159, BA160 и эталонное антитело к TIGIT элюировались при подобной ионной силе (т. е. через 10,8, 10,9 и 11,3 минуты соответственно), что указывает на то, что все антитела обладают сопоставимой гидрофобностью.

8.5.6 Устойчивость антител к TIGIT человека в условиях стрессового воздействия

[00289] Тестировали устойчивость BA159, BA160 и эталонного антитела к TIGIT к разрыву межцепочечных дисульфидных связей, отсечению и агрегации при выдерживании при высокой температуре и повторяющихся циклах замораживания-оттаивания.

[00290] Вкратце, каждое антитело подвергали воздействию температуры 40°C в течение 28 дней или 5 циклам замораживания-оттаивания, а контрольный образец хранили при -80°C. Затем каждый образец анализировали с помощью CE SDS в невозстанавливающих условиях, CE SDS в восстанавливающих условиях и с помощью эксклюзионной хроматографии.

[00291] Каждое антитело разводили до концентрации 1 мг/мл в 1x PBS, pH 7,4 (11,9 мМ PO_4 , 137 мМ NaCl, 2,7 KCl), и разделяли на три аликвоты по 200 мкл. Одну аликвоту хранили при -80°C в качестве контроля, одну хранили при 40°C в течение 28 дней и еще одну подвергали 5 циклам замораживания до -80°C и оттаивания до комнатной температуры. Эксклюзионную хроматографию проводили, как описано в примере 5. CE SDS проводили, как описано в примере 4, за исключением того, что 1) два образца разводили до концентрации 0,1 мг/мл в буфере для образцов Protein Express, один образец, как описано выше, и один образец с 1:10 объема 0,4 М DTT, добавленного в буфер для образцов Protein Express перед разведением, и 2) все образцы (анализируемые в восстанавливающих и невозстанавливающих условиях) нагревали при 80°C в течение 5

минут.

[00292] На фиг. 12А-12I, 13А-13I и 14А-14I, а также в таблицах 7-13 показаны изменения в разрывах межцепочечных дисульфидных связей, отсечении и агрегации для ВА159, ВА160 и эталонного антитела к TIGIT после выдерживания в условиях высокой температуры и повторяющихся циклов замораживания-оттаивания. В условиях выдерживания при высокой температуре наблюдали лишь небольшие изменения, и они были подобными для ВА159, ВА160 и эталонного антитела к TIGIT. После повторных циклов замораживания-оттаивания не наблюдали никаких изменений ни для одной из молекул.

Таблица 7. Межцепочечные дисульфидные связи в молекулах ВА159 в условиях стрессового воздействия.

Цепи, связанные дисульфидными связями	Прибл. размер (кДа)	ВА159, контроль	ВА159, 40 градусов/28 дней	ВА159, 5-кратное замораживание-оттаивание
Неизвестно	255	0%	0%	0%
LHNL	179	94%	86%	93%
Неизвестно	170	0%	4%	1%
NHL	158	2%	3%	2%
NN	128	3%	2%	3%
HL	99	0%	1%	0%
H	65	0%	2%	0%
L	39	0%	1%	1%

Таблица 8. Межцепочечные дисульфидные связи в молекулах ВА160 в условиях стрессового воздействия.

Цепи, связанные дисульфидными связями	Прибл. размер (кДа)	ВА160, контроль	ВА160, 40 градусов/28 дней	ВА160, 5-кратное замораживание-оттаивание
Неизвестно	255	0%	0%	2%
LHNL	179	98%	92%	95%
Неизвестно	170	0%	5%	0%
NHL	158	1%	2%	1%
NN	128	0%	0%	0%
HL	99	0%	0%	0%
H	65	0%	0%	0%
L	39	0%	0%	0%

Таблица 9. Межцепочечные дисульфидные связи в молекулах эталонного антитела к TIGIT в условиях стрессового воздействия.

Цепи, связанные дисульфидными	Прибл. размер	Эталонное антитело к	Эталонное антитело к	Эталонное антитело к TIGIT,
-------------------------------	---------------	----------------------	----------------------	-----------------------------

связями	(кДа)	TIGIT, контроль	TIGIT, 40 градусов/28 дней	5-кратное замораживание- оттаивание
LHNL	166	89%	79%	88%
Неизвестно	158	1%	7%	1%
NNL	142	3%	6%	4%
NN	115	1%	4%	4%
NL	85	4%	1%	1%
N	61	1%	2%	1%
L	36	1%	1%	1%

Таблица 10. Наличие полноразмерных тяжелой и легкой цепей ВА159 в условиях стрессового воздействия.

Цепи, связанные дисульфидными связями	Прибл. размер (кДа)	ВА159, контроль	ВА159, 40 градусов/28 дней	ВА159, 5-кратное замораживание- оттаивание
NL	102	0%	5%	0%
N	63	75%	70%	75%
Неизвестно	50	0%	0%	0%
L	38	25%	24%	25%

Таблица 11. Наличие полноразмерных тяжелой и легкой цепей ВА160 в условиях стрессового воздействия.

Цепи, связанные дисульфидными связями	Прибл. размер (кДа)	ВА160, контроль	ВА160, 40 градусов/28 дней	ВА160, 5-кратное замораживание- оттаивание
NL	102	0%	1%	0%
N	63	75%	72%	75%
Неизвестно	50	0%	1%	0%
L	38	25%	25%	25%

Таблица 12. Наличие полноразмерных тяжелой и легкой цепей эталонного антитела к TIGIT в условиях стрессового воздействия

Цепи, связанные дисульфидными связями	Прибл. размер (кДа)	Эталонное антитело к TIGIT, контроль	Эталонное антитело к TIGIT, 40 градусов/28 дней	Эталонное антитело к TIGIT, 5-кратное замораживание- оттаивание
NL	103	1%	8%	1%
N	102	73%	66%	72%
Неизвестно	104	0%	1%	0%
L	109	26%	25%	27%

Таблица 13. Наличие видов ВА159, ВА160 и эталонного антитела к TIGIT в условиях стрессового воздействия.

	% высокомолекулярных разновидностей	% мономеров	% низкомолекулярных разновидностей
ВА159, контроль	1,2	98,8	0
ВА159, выдерживание при высокой температуре	3,4	94,9	1,7
ВА159, 5-кратное замораживание-оттаивание	1,1	98,9	0
ВА160, контроль	1,6	98,3	0
ВА160, выдерживание при высокой температуре	3,4	94,9	1,7
ВА160, 5-кратное замораживание-оттаивание	1,3	98,7	0
Эталонное антитело к TIGIT, контроль	3,6	96,4	0
Эталонное антитело к TIGIT, выдерживание при высокой температуре	3,8	93,7	2,6
Эталонное антитело к TIGIT, 5-кратное замораживание-оттаивание	1,8	98,2	0

8.6 Пример 6. Связывание ВА159 с активированными Т-клетками человека

[00293] Тестировали способность ВА159 связываться с активированными Т-клетками человека и сравнивали ее со связыванием антитела изотипического контроля.

[00294] Для получения активированных Т-клеток замороженную аликвоту РВМС человека от здорового донора извлекали из жидкого азота и немедленно оттаивали в воде с температурой 37°C до появления плавающего льда. Затем клетки переносили в 10 мл предварительно нагретой среды R10. 20 мкл отбирали и добавляли к 380 мкл красителя для определения жизнеспособности. Клетки подсчитывали и проверяли их жизнеспособность с применением аппарата Muse. Затем образцы центрифугировали при 1200 об/мин в течение пяти минут и суспендировали до конечной концентрации 1×10^6 клеток/мл в среде R10. Клетки стимулировали с помощью 1 мкг/мл антитела к CD3 и 100 мкл простимулированных клеток вносили пипеткой в каждую лунку 96-луночного круглодонного планшета для тканевых культур. Планшеты инкубировали при 37°C в 5% CO₂ в течение четырех дней.

[00295] Спустя четыре дня планшеты с образцами центрифугировали в течение двух минут при 2000 об/мин и супернатанты отбрасывали. Образцы блокировали с помощью блокирующего раствора для Fc γ R, полученного в буфере для FACS, из расчета 5 мкл на 100 мкл в течение 10 минут. Затем планшеты с образцами центрифугировали в течение двух минут при 2000 об/мин и супернатант отбрасывали. Затем клетки ресуспендировали в 100 мкл ВА159 или соответствующего антитела изотипического контроля. Для получения антител каждое антитело разводили до концентрации 40 мкг/мл в буфере до конечного объема 200 мкл. Затем антитела последовательно разводили в соотношении 1 к 4 с получением в общей сложности 12 разведений в диапазоне от 40 мкг/мл до 0,00000954 мкг/мл.

[00296] Планшеты с образцами инкубировали в течение 30 минут при 4°C. Клетки промывали путем добавления холодного буфера для образцов, центрифугировали в течение двух минут при 2000 об/мин и супернатант отбрасывали. Данную промывку повторяли еще один раз.

[00297] Затем клетки ресуспендировали в смеси из меченых флуоресцентной меткой антител, приготовленной в буфере для FACS. В круглодонный 96-луночный планшет добавляли по 100 мкл антитела на лунку. Планшет с образцами инкубировали в течение 20 минут на льду. Затем клетки промывали путем добавления холодного буфера для образцов, центрифугировали в течение двух минут при 2000 об/мин и супернатанты отбрасывали. Данную промывку повторяли еще один раз. Получали конечную смесь из PE-меченого вторичного антитела к IgG человека, приготовленной в 11 мл буфера для FACS. Добавляли 100 мкл вторичного антитела на лунку в круглодонный 96-луночный планшет. Затем планшет с образцами инкубировали в течение 5 минут на льду. Клетки промывали путем добавления холодного буфера для образцов, центрифугировали в течение двух минут при 2000 об/мин и супернатанты отбрасывали. Данную промывку повторяли еще один раз.

[00298] Связывание антител измеряли методом проточной цитометрии с применением проточного цитометра BD LSR Fortessa. Неокрашенные контрольные клетки применяли для гейтирования популяции лимфоцитов с применением графика площади прямого рассеяния (FSC-A) относительно площади бокового рассеяния (SSC-A) и другого графика FSC-A относительно FSC-высоты (FSC-H) для отбора одиночных клеток. Пробирки с клетками, окрашенными каждым отдельным антителом, использовали для расчета компенсации различных цветов, использованных в эксперименте. Для каждого образца регистрировали 100000 событий. Образцы анализировали путем последовательного гейтирования следующих популяций: FSC-A относительно SSC-A, FSC-H относительно FSC-A, SSC-A относительно LIVE/DEAD и CD4 относительно CD8; рассчитывали среднюю интенсивность флуоресценции (MFI).

[00299] Как показано на фиг. 15A и 15B, ВА159 связывался с активированными CD4⁺ Т-клетками (фиг. 15A) и активированными CD8⁺ Т-клетками (фиг. 15B) дозозависимым образом.

8.7 Пример 7. Блокирование связывания TIGIT/PVR с помощью BA159 и BA160

8.7.1 Блокирование связывания TIGIT/PVR антителом к TIGIT, BA159

[00300] В данном примере анализировали способность BA159 блокировать передачу ингибирующих сигналов TIGIT/CD155 и сравнивали ее с блокированием антителом изотипического контроля.

[00301] Анализ с репортером проводили в соответствии с протоколом производителя (Promega). Использовали эффекторные Т-клетки Jurkat, сконструированные для экспрессии TIGIT человека с люциферазным репортером. Люциферазный репортер управляется нативным промотором, который может отвечать как на активацию TCR, так и на костимуляцию CD226. Клетки извлекали из жидкого азота и немедленно оттаивали в воде при температуре 37°C до появления плавающего льда. Затем клетки переносили в 12 мл предварительно нагретого (37°C) буфера для анализа (90% RPMI 1640/10% FBS) в конической пробирке. Клеточную суспензию осторожно перемешивали, переносили в стерильный резервуар и 80 мкл клеточной суспензии переносили во внутренние 60 лунок 96-луночного белого аналитического планшета с плоским дном. В каждую из внешних лунок планшетов для анализа добавляли по 120 мкл предварительно нагретого (37°C) буфера для анализа. Затем клетки инкубировали в течение 16-20 часов при 37°C в 5% CO₂.

[00302] Диапазон доз каждого антитела получали из 6-кратного концентрированного промежуточного исходного раствора в микроцентрифужных пробирках объемом 1,2 мл. Сначала готовили промежуточный исходный раствор с концентрацией 50 мкг/мл в буфере для анализа, а затем антитела последовательно разводили в соотношении 1 к 2,5. Всего готовили 10 разведений в буфере для анализа в диапазоне от 50 мкг/мл до 0,0131 мкг/мл. Добавляли 20 мкл разведенного антитела на лунку к предварительно высевным эффекторным клеткам с TIGIT.

[00303] Использовали клетки CHO-K1, сконструированные для экспрессии CD155 человека со сконструированным белком клеточной поверхности (клетки CD155 aAPC/CHO-K1). Белок клеточной поверхности активирует комплекс TCR антигеннезависимым образом. Клетки извлекали из жидкого азота и немедленно оттаивали в воде при температуре 37°C до появления плавающего льда. Затем клетки переносили в коническую пробирку объемом 15 мл, содержащую 3 мл буфера для анализа. Клеточную суспензию осторожно перемешивали, переносили в стерильный резервуар и затем 20 мкл клеточной суспензии переносили к предварительно высевным эффекторным клеткам с TIGIT и смеси антител. Конечный объем анализа составлял 120 мкл.

[00304] Затем клетки инкубировали в течение 6 часов при 37°C в 5% CO₂. После инкубации аналитические планшеты извлекали из инкубатора и оставляли для уравнивания до температуры окружающей среды в течение 10 минут. Затем в каждую лунку добавляли по 120 мкл реагента Bio-Glo™ и инкубировали планшеты в

течение 5 минут при комнатной температуре. Относительные световые единицы (RLU) измеряли с применением люминесцентного планшет-ридера EnVision. Результаты наносили на график в GraphPad Prism и кривые аппроксимировали с применением нелинейной регрессии.

[00305] Как показано на фиг. 16А и 16В, ВА159 вызывало дозозависимое увеличение продуцирования люциферазы, которая является заменителем активации TCR и активации пути CD226, что измеряли в относительных световых единицах (RLU). На фиг. 16А и фиг. 16В представлены независимые эксперименты, проведенные в два разных дня.

8.7.2 Блокирование связывания TIGIT/PVR антителами к TIGIT ВА159 и ВА160

[00306] В данном примере анализировали способность ВА159, ВА160 и антитела изотипического контроля блокировать передачу ингибирующего сигнала TIGIT/CD155.

[00307] Анализ проводили в соответствии с протоколом производителя (Promega). Использовали эффекторные Т-клетки Jurkat, сконструированные для экспрессии TIGIT человека с люциферазным репортером. Люциферазный репортер управляется нативным промотором, который может отвечать как на активацию TCR, так и на костимуляцию CD226. Клетки извлекали из жидкого азота и немедленно оттаивали в воде при температуре 37°C до появления плавающего льда. Затем клетки переносили в 12 мл предварительно нагретого (37°C) буфера для анализа (90% RPMI 1640/10% FBS) в конической пробирке. Клеточную суспензию осторожно перемешивали, переносили в стерильный резервуар и 80 мкл клеточной суспензии переносили во внутренние 60 лунок 96-луночного белого аналитического планшета с плоским дном. В каждую из внешних лунок планшетов для анализа добавляли по 120 мкл предварительно нагретого (37°C) буфера для анализа. Затем клетки инкубировали в течение 16-20 часов при 37°C в 5% CO₂.

[00308] Диапазон доз каждого антитела получали из 6-кратного концентрированного промежуточного исходного раствора в микроцентрифужных пробирках объемом 1,2 мл. Сначала готовили промежуточный исходный раствор с концентрацией 50 мкг/мл в буфере для анализа, а затем антитела последовательно разводили в соотношении 1 к 2,5. Всего получали 10 разведений в буфере для анализа в диапазоне от 50 мкг/мл до 0,0131 мкг/мл. Добавляли 20 мкл антитела на лунку к предварительно высеванным эффекторным клеткам с TIGIT.

[00309] Использовали клетки CHO-K1, сконструированные для экспрессии CD155 человека со сконструированным белком клеточной поверхности (клетки CD155 aAPC/CHO-K1). Белок клеточной поверхности активирует комплекс TCR антигеннезависимым образом. Клетки извлекали из жидкого азота и немедленно оттаивали в воде при температуре 37°C до появления плавающего льда. Затем клетки переносили в коническую пробирку объемом 15 мл, содержащую 3 мл буфера для анализа. Клеточную суспензию осторожно перемешивали, переносили в стерильный резервуар и 20 мкл клеточной суспензии переносили к предварительно высеванным эффекторным клеткам с TIGIT и смеси антител. Конечный объем анализа составлял 120

мкл.

[00310] Затем клетки инкубировали в течение 6 часов при 37°C в 5% CO₂. После инкубации аналитические планшеты извлекали из инкубатора и оставляли для уравнивания до температуры окружающей среды в течение 10 минут. Затем в каждую лунку добавляли по 120 мкл реагента Bio-Glo™ и инкубировали планшеты в течение 5 минут при комнатной температуре. Относительные световые единицы (RLU) измеряли с применением люминесцентного планшет-ридера EnVision. Результаты наносили на график в GraphPad Prism и кривые аппроксимировали с применением нелинейной регрессии.

[00311] На фиг. 17 показано, что как BA159, так и BA160 блокировали связывание между TIGIT и PVR дозозависимым образом.

8.8 Пример 8. Стимуляция продуцирования IL-2 с помощью BA159, BA260, BA261, BA262 и BA160

8.8.1 Стимуляция продуцирования IL-2 с помощью антител к TIGIT, BA159, BA260, BA261 и BA262

[00312] В данном примере показана способность антител к TIGIT, BA159, BA260, BA261 и BA262, а также антитела изотипического контроля IgG₁ стимулировать продуцирование IL-2 в PBMC, простимулированных SEA.

[00313] Каждое антитело готовили в 5-кратной концентрации, составляющей 50 мкг/мл (конечная концентрация составляет 10 мкг/мл) в среде R10. По 20 мкл каждого антитела к TIGIT или антитела изотипического контроля добавляли в соответствующие лунки 96-луночного круглодонного планшета.

[00314] Замороженные аликвоты PBMC человека от трех независимых здоровых доноров извлекали из жидкого азота и немедленно оттаивали в воде при температуре 37°C до появления плавающего льда. Клетки переносили в 10 мл предварительно подогретой среды R10 и немедленно центрифугировали при 1200 об/мин в течение пяти минут. Для подсчета клеток и проверки жизнеспособности отбирали 20 мкл образца и добавляли к 380 мкл красителя для определения жизнеспособности, перемешивали и считывали с применением прибора Muse. Затем клетки центрифугировали при 1200 об/мин в течение пяти минут и ресуспендировали в среде R10.

[00315] Промежуточную исходную концентрацию SEA получали путем добавления 10 мкл SEA с концентрацией 10 мкг/мл к 90 мкл R10 с получением промежуточной концентрации, составляющей 1 мкг/мл. Сначала клетки стимулировали пептидом SEA, и 80 мкл смеси клеток и SEA добавляли в соответствующие лунки с антителами, и инкубировали в инкубаторе для тканевых культур при 37°C в 5% CO₂ в увлажненной камере в течение четырех дней. Использовали в общей сложности 100000 клеток на лунку и конечную концентрацию SEA, составляющую 1 нг/мл.

[00316] После четырех дней инкубации планшеты удаляли из инкубатора. Затем планшеты центрифугировали в течение двух минут при 2000 об/мин. Для анализа цитокинов 5 мкл супернатанта переносили в 384-луночный планшет AlphaLISA. Для

измерения секреции IL-2 применяли наборы AlphaLISA (Perkin Elmer). Вкратце, буфер для анализа готовили путем добавления 2,5 мл 10-кратного буфера для иммуноанализа AlphaLISA к 22,5 мл воды. Аналит IL-2 человека использовали для получения стандартного разведения. В буфере для анализа готовили смесь 1,6-кратных акцепторных гранул AlphaLISA для связывания IL-2 и биотинилированного антитела к IL-2. Добавляли по 8 мкл в каждую лунку и инкубировали в темноте при комнатной температуре. Планшеты AlphaLISA кратковременно центрифугировали при 2000 об/мин. В буфере для анализа готовили 2,3-кратный промежуточный исходный раствор донорных гранул со стрептавидином. Затем добавляли по 10 мкл в каждую лунку и инкубировали в темноте при комнатной температуре. Планшеты AlphaLISA кратковременно центрифугировали при 2000 об/мин. Затем измеряли относительные световые единицы (RLU) на планшет-ридере EnVision с применением протокола AlphaScreen. Результаты наносили на график в GraphPad Prism и проводили статистические анализы с применением непарного t-критерия.

[00317] Как показано на фиг. 18A-18C, BA159, BA260, BA261 и BA262 стимулировали продуцирование IL-2.

8.8.2 Стимуляция продуцирования IL-2 комбинацией антител к TIGIT, BA159, BA260, BA261 и BA262, и антитела к PD-1

[00318] В данном примере показана способность антител к TIGIT, BA159, BA260, BA261 и BA262, и антитела изотипического контроля IgG₁ стимулировать продуцирование IL-2 в PBMC, простимулированных SEA, в присутствии или в отсутствие антитела к PD-1.

[00319] Каждое антитело готовили в 5-кратной концентрации, составляющей 50 мкг/мл (конечная концентрация составляет 10 мкг/мл) в среде R10. В случае комбинаций антитело к TIGIT или антитело изотипического контроля смешивали с равной концентрацией антитела к PD-1 (ниволумаб) при 5-кратной концентрации, составляющей 50 мкг/мл (конечная концентрация составляет 10 мкг/мл) в среде R10. По 20 мкл каждого антитела к TIGIT или антитела изотипического контроля добавляли в соответствующие лунки 96-луночного круглодонного планшета. В случае комбинаций с антителом к PD-1 20 мкл антитела к PD-1 также добавляли в лунку.

[00320] Замороженные аликвоты PBMC человека от двух независимых здоровых доноров извлекали из жидкого азота и немедленно оттаивали в воде при температуре 37°C до появления плавающего льда. Клетки переносили в 10 мл предварительно подогретой среды R10 и немедленно центрифугировали при 1200 об/мин в течение пяти минут. Для подсчета клеток и проверки жизнеспособности отбирали 20 мкл образца и добавляли к 380 мкл красителя для определения жизнеспособности, перемешивали и считывали с применением прибора Muse. Затем клетки центрифугировали при 1200 об/мин в течение пяти минут и ресуспендировали в среде R10.

[00321] Промежуточную исходную концентрацию SEA получали путем добавления 10 мкл SEA с концентрацией 10 мкг/мл к 90 мкл R10 с получением

промежуточной концентрации, составляющей 1 мкг/мл. Сначала клетки стимулировали пептидом SEA, и 80 мкл смеси клеток и SEA добавляли в соответствующие лунки с антителами, и инкубировали в инкубаторе для тканевых культур при 37°C в 5% CO₂ в увлажненной камере в течение четырех дней. Использовали в общей сложности 100000 клеток на лунку и конечную концентрацию SEA, составляющую 1 нг/мл.

[00322] После четырех дней инкубации планшеты удаляли из инкубатора. Затем планшеты центрифугировали в течение двух минут при 2000 об/мин. Для анализа цитокинов 5 мкл супернатанта переносили в 384-луночный планшет AlphaLISA. Для измерения секреции IL-2 применяли наборы AlphaLISA (Perkin Elmer). Вкратце, буфер для анализа готовили путем добавления 2,5 мл 10-кратного буфера для иммуноанализа AlphaLISA к 22,5 мл воды. Аналит IL-2 человека использовали для получения стандартного разведения. В буфере для анализа готовили смесь 1,6-кратных акцепторных гранул AlphaLISA для связывания IL-2 и биотинилированного антитела к IL-2. Добавляли по 8 мкл в каждую лунку и инкубировали в темноте при комнатной температуре. Планшеты AlphaLISA кратковременно центрифугировали при 2000 об/мин. В буфере для анализа готовили 2,3-кратный промежуточный исходный раствор донорных гранул со стрептавидином. Затем добавляли по 10 мкл в каждую лунку и инкубировали в темноте при комнатной температуре. Планшеты AlphaLISA кратковременно центрифугировали при 2000 об/мин. Затем измеряли относительные световые единицы (RLU) на планшет-ридере EnVision с применением протокола AlphaScreen. Результаты наносили на график в GraphPad Prism и проводили статистические анализы с применением непарного t-критерия.

[00323] Как показано на фиг. 19А и 19В, ВА159, ВА260, ВА261 и ВА262 стимулировали продуцирование IL-2. Данный эффект усиливался, когда клетки обрабатывали как антителом к TIGIT, так и антителом к PD-1.

8.8.3 Стимуляция продуцирования IL-2 с помощью ВА159 и ВА160

[00324] В данном примере способность ВА159, ВА160 и антитела изотипического контроля вызывать секрецию IL-2 в РВМС, простимулированных SEA, на протяжении диапазона концентраций антител у двух разных доноров.

[00325] Диапазон доз каждого антитела к TIGIT или соответствующего антитела изотипического контроля готовили из 5-кратного концентрированного промежуточного исходного раствора в микроцентрифужных пробирках объемом 1,2 мл. Сначала готовили промежуточный исходный раствор с концентрацией 50 мкг/мл в среде R10, а затем антитела последовательно разводили в соотношении 1 к 10. Всего получали 8 разведений в среде R10 в диапазоне от 50 мкг/мл до 0,000005 мкг/мл. Добавляли 20 мкл антитела на лунку в круглодонный 96-луночный планшет.

[00326] Замороженные аликвоты РВМС человека от двух независимых здоровых доноров извлекали из жидкого азота и немедленно оттаивали в воде при температуре 37°C до появления плавающего льда. Клетки переносили в 10 мл предварительно подогретой среды R10 и немедленно центрифугировали при 1500 об/мин в течение пяти минут.

Супернатант отбрасывали и клетки ресуспендировали в свежей среде R10. Для подсчета клеток и проверки жизнеспособности отбирали 20 мкл образца и добавляли к 380 мкл красителя для определения жизнеспособности, перемешивали и считывали с применением прибора Muse.

[00327] Клетки ресуспендировали до промежуточной концентрации. Промежуточную исходную концентрацию SEA получали путем добавления 10 мкл SEA с концентрацией 10 мкг/мл к 90 мкл R10 с получением промежуточной концентрации, составляющей 1 мкг/мл. Сначала клетки стимулировали пептидом SEA, и 80 мкл смеси клеток и SEA добавляли в соответствующие лунки, и инкубировали в инкубаторе для тканевых культур при 37°C в 5% CO₂ в увлажненной камере в течение четырех дней. Использовали в общей сложности 100000 клеток на лунку и конечную концентрацию SEA, составляющую 1 нг/мл.

[00328] После четырех дней инкубации планшеты удаляли из инкубатора. Затем планшеты центрифугировали в течение двух минут при 2000 об/мин. Для анализа цитокинов 5 мкл супернатанта переносили в 384-луночный планшет AlphaLISA. Для измерения секреции IL-2 применяли наборы AlphaLISA (Perkin Elmer). Вкратце, буфер для анализа готовили путем добавления 2,5 мл 10-кратного буфера для иммуноанализа AlphaLISA к 22,5 мл воды. Аналит IL-2 человека использовали для получения стандартного разведения. В буфере для анализа готовили смесь 1,6-кратных акцепторных гранул AlphaLISA для связывания IL-2 и биотинилированного антитела к IL-2. Добавляли по 8 мкл в каждую лунку и инкубировали в темноте при комнатной температуре. Планшеты AlphaLISA кратковременно центрифугировали при 2000 об/мин. В буфере для анализа готовили 2,3-кратный промежуточный исходный раствор донорных гранул со стрептавидином. Затем добавляли по 10 мкл в каждую лунку и инкубировали в темноте при комнатной температуре. Планшеты AlphaLISA кратковременно центрифугировали при 2000 об/мин. Затем измеряли относительные световые единицы (RLU) на планшет-ридере EnVision с применением протокола AlphaScreen. Результаты наносили на график в GraphPad Prism и кривые аппроксимировали с применением нелинейной регрессии.

[00329] Как показано на фиг. 20A и 20B, как BA159, так и BA160 вызывали секрецию IL-2 из РВМС, простимулированных SEA, дозозависимым образом у двух разных доноров.

* * *

[00330] Объем настоящего изобретения не должен ограничиваться конкретными описанными в данном документе вариантами осуществления. Безусловно, из приведенного выше описания и сопровождающих фигур специалистам в данной области техники станут очевидны различные модификации настоящего изобретения в дополнение к описанным. Подразумевается, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

[00331] Все литературные источники (например, публикации, или патенты, или заявки на патент), упомянутые в данном документе, включены в данный документ

посредством ссылки во всей своей полноте и для всех целей в той же степени, как если бы каждый отдельный литературный источник (например, публикация, или патент, или заявка на патент) был конкретно и отдельно указан как включенный посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей.

[00332] Под объем представленной далее формулы изобретения подпадают и другие варианты осуществления.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело, которое специфически связывается с TIGIT человека, при этом антитело содержит:

(a) VH, содержащую аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из аминокислотной последовательности VH под SEQ ID NO: 7; и/или

(b) VL, содержащую аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из аминокислотной последовательности VL под SEQ ID NO: 9,

где VH содержит лизин в аминокислотном положении 12, серин в аминокислотном положении 16, лизин в аминокислотном положении 73, серин в аминокислотном положении 76, аланин в аминокислотном положении 78 и/или аргинин в аминокислотном положении 83 соответственно, и

где VL содержит лизин в аминокислотном положении 45, глицин в аминокислотном положении 57, валин в аминокислотном положении 58 и/или аланин в аминокислотном положении 80,

причем в каждом случае нумерация выполнена в соответствии с Kabat.

2. Выделенное антитело по п. 1, где:

(a) VH содержит лизин, серин, лизин, серин, аланин и аргинин в аминокислотных положениях 12, 16, 73, 76, 78 и 83 соответственно, и VL содержит лизин, глицин, валин и аланин в аминокислотных положениях 45, 57, 58 и 80 соответственно;

(b) VH содержит лизин, серин и аргинин в аминокислотных положениях 12, 16 и 83 соответственно, и VL содержит лизин и аланин в аминокислотных положениях 45 и 80 соответственно;

(c) VH содержит лизин, серин, лизин, серин, аланин и аргинин в аминокислотных положениях 12, 16, 73, 76, 78 и 83 соответственно, и VL содержит лизин и аланин в аминокислотных положениях 45 и 80 соответственно; или

(d) VH содержит лизин, серин и аргинин в аминокислотных положениях 12, 16 и 83 соответственно, и VL содержит лизин, глицин, валин и аланин в аминокислотных положениях 45, 57, 58 и 80 соответственно,

пронумерованных в соответствии с Kabat.

3. Выделенное антитело по п. 1 или п. 2, где антитело содержит аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 под SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 и 6 соответственно.

4. Выделенное антитело по любому из пп. 1-3, где антитело содержит аминокислотную последовательность VH под SEQ ID NO: 7 или 8.

5. Выделенное антитело по п. 4, где аминокислотная последовательность VH состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7 или 8.

6. Выделенное антитело по любому из пп. 1-3, где антитело содержит аминокислотную последовательность VL под SEQ ID NO: 9 или 10.

7. Выделенное антитело по п. 6, где аминокислотная последовательность VL состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 9 или 10.

8. Выделенное антитело, которое специфически связывается с TIGIT человека, при этом антитело содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7 или 8, и/или VL, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 9 или 10.

9. Выделенное антитело по п. 8, где аминокислотная последовательность VH состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7 или 8, и/или аминокислотная последовательность VL состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 9 или 10.

10. Выделенное антитело по п. 8 или п. 9, где антитело содержит аминокислотные последовательности VH и VL под SEQ ID NO: 7 и 9; 7 и 10; 8 и 9 или 8 и 10 соответственно.

11. Выделенное антитело по п. 10, где аминокислотные последовательности VH и VL состоят из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 7 и 9; 7 и 10; 8 и 9 или 8 и 10 соответственно.

12. Выделенное антитело по любому из предыдущих пунктов, где антитело содержит константную область тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂ человека.

13. Выделенное антитело по п. 12, где антитело содержит константную область тяжелой цепи IgG₁.

14. Выделенное антитело по п. 13, где антитело содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16.

15. Выделенное антитело по п. 13, где аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG₁ содержит мутацию N297A, пронумерованную в соответствии с системой нумерации EU.

16. Выделенное антитело по любому из предыдущих пунктов, где антитело содержит константную область тяжелой цепи, которая является вариантом константной области тяжелой цепи дикого типа, где вариант константной области тяжелой цепи связывается с FcγR с большей аффинностью, чем константная область тяжелой цепи дикого типа связывается с FcγR.

17. Выделенное антитело по п. 16, где FcγR представляет собой FcγRIIB или FcγRIIA.

18. Выделенное антитело по п. 13, где аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG₁ содержит мутации S267E и L328F, пронумерованные в соответствии с системой нумерации EU.

19. Выделенное антитело по п. 13, где аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG₁ содержит по меньшей мере одну мутацию, выбранную из группы, состоящей из мутаций S239D, A330L и I332E, пронумерованных в соответствии с системой нумерации EU.

20. Выделенное антитело по п. 13, где аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG₁ содержит мутации S239D, A330L и I332E, пронумерованные в соответствии с системой нумерации EU.

21. Выделенное антитело по любому из предыдущих пунктов, где антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 11, 12, 19 или 20.

22. Выделенное антитело по п. 21, где аминокислотная последовательность тяжелой цепи состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 11, 12, 19 или 20.

23. Выделенное антитело по любому из предыдущих пунктов, где антитело содержит константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 17 или 18.

24. Выделенное антитело по любому из предыдущих пунктов, где антитело содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 13, 14, 15 или 21.

25. Выделенное антитело по п. 24, где аминокислотная последовательность легкой цепи состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 13, 14, 15 или 21.

26. Выделенное антитело, которое специфически связывается с TIGIT человека, где антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 11, 12, 19 или 20, и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 13, 14, 15 или 21.

27. Выделенное антитело по п. 26, где аминокислотная последовательность тяжелой цепи состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 11, 12, 19 или 20, и/или аминокислотная последовательность легкой цепи состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 13, 14, 15 или 21.

28. Выделенное антитело по п. 26 или п. 27, где тяжелая цепь и легкая цепь содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 11 и 13; 11 и 14; 11 и 15; 11 и 21; 12 и 13; 12 и 14; 12 и 15; 12 и 21; 19 и 13; 19 и 14; 19 и 15; 19 и 21; 20 и 13; 20 и 14; 20 и 15 или 20 и 21 соответственно.

29. Выделенное антитело по п. 28, где аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи состоят из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 11 и 13; 11 и 14; 11 и 15; 11 и 21; 12 и 13; 12 и 14; 12 и 15; 12 и 21; 19 и 13; 19 и 14; 19 и 15; 19 и 21; 20 и 13; 20 и 14; 20 и 15 или 20 и 21 соответственно.

30. Выделенное антитело по любому из предыдущих пунктов, где антитело является полиспецифическим.

31. Выделенное антитело по любому из предыдущих пунктов, где выделенное антитело конъюгировано с цитотоксическим средством, цитостатическим средством, токсином, радионуклидом или детектируемой меткой.

32. Выделенное антитело по любому из предыдущих пунктов, где выделенное антитело конъюгировано с антителом.

33. Выделенный полинуклеотид, кодирующий VH и/или VL или тяжелую цепь и/или легкую цепь выделенного антитела по любому из предыдущих пунктов.

34. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 33.

35. Рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая:

(a) полинуклеотид по п. 33;

(b) вектор по п. 34;

(c) полинуклеотид, кодирующий VH и VL или тяжелую цепь и легкую цепь выделенного антитела по любому из пп. 1-32;

(d) вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий VH и VL или тяжелую цепь и легкую цепь выделенного антитела по любому из пп. 1-32;

(e) первый полинуклеотид, кодирующий VH или тяжелую цепь выделенного антитела по любому из пп. 1-32, и второй полинуклеотид, кодирующий VL или легкую цепь выделенного антитела по любому из пп. 1-32; или

(f) первый вектор, содержащий первый полинуклеотид, кодирующий VH или тяжелую цепь выделенного антитела по любому из пп. 1-32, и второй вектор, содержащий второй полинуклеотид, кодирующий VL или легкую цепь выделенного антитела по любому из пп. 1-32.

36. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное антитело по любому из пп. 1-32, полинуклеотид по п. 33, вектор по п. 34 или клетку-хозяина по п. 35 и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество.

37. Способ получения выделенного антитела, при этом способ включает культивирование клетки-хозяина по п. 35 в подходящих условиях, так что экспрессируется полинуклеотид и продуцируется выделенное антитело.

38. Способ получения выделенного антитела, при этом способ включает экспрессию в клетке:

(a) первого полинуклеотида, кодирующего VH антитела по любому из пп. 1-32, и второго полинуклеотида, кодирующего VL антитела по любому из пп. 1-32; или

(b) первого полинуклеотида, кодирующего тяжелую цепь антитела по любому из пп. 1-32, и второго полинуклеотида, кодирующего легкую цепь антитела по любому из пп. 1-32,

в подходящих условиях, так что экспрессируются полинуклеотиды и продуцируется антитело.

39. Способ усиления иммунного ответа у субъекта, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества выделенного антитела по любому из пп. 1-32, полинуклеотида по п. 33, вектора по п. 34, клетки-хозяина по п. 35 или фармацевтической композиции по п. 36.

40. Способ лечения рака у субъекта, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества выделенного антитела по любому из пп. 1-32, полинуклеотида по п. 33, вектора по п. 34, клетки-хозяина по п. 35 или фармацевтической композиции по п. 36.

41. Способ по п. 39 или п. 40, где выделенное антитело, полинуклеотид, вектор, клетку-хозяина или фармацевтическую композицию вводят системно, внутривенно, подкожно, внутрь опухоли или доставляют в дренирующей опухоли лимфатический узел.

42. Способ по любому из пп. 39-41, дополнительно включающий введение субъекту дополнительного терапевтического средства.

43. Способ по п. 42, где дополнительным терапевтическим средством является химиотерапевтическое средство.

44. Способ по п. 43, где дополнительным терапевтическим средством является средство, нацеливающееся на контрольную точку иммунного ответа.

45. Способ по п. 44, где средство, нацеливающееся на контрольную точку иммунного ответа, выбрано из группы, состоящей из антагонистического антитела к PD-1, антагонистического антитела к PD-L1, антагонистического антитела к PD-L2, антагонистического антитела к CTLA-4, антагонистического антитела к TIM-3, антагонистического антитела к LAG-3, антагонистического антитела к VISTA, антагонистического антитела к TIGIT, антагонистического антитела к CEACAM1, антагонистического антитела к CD96, агонистического антитела к GITR и агонистического антитела к OX40.

46. Способ по п. 45, где дополнительным терапевтическим средством является антитело к PD-1, где необязательно антитело к PD-1 является пембролизумабом или ниволумабом.

47. Способ по п. 42, где дополнительным терапевтическим средством является ингибитор индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO).

48. Способ по п. 47, где ингибитор выбран из группы, состоящей из эпакадостата, F001287, индоксимода и NLG919.

49. Способ по п. 42, где дополнительным терапевтическим средством является вакцина.

50. Способ по п. 49, где вакцина содержит комплекс белок теплового шока-пептид (HSPPC), содержащий белок теплового шока в комплексе с антигенным пептидом.

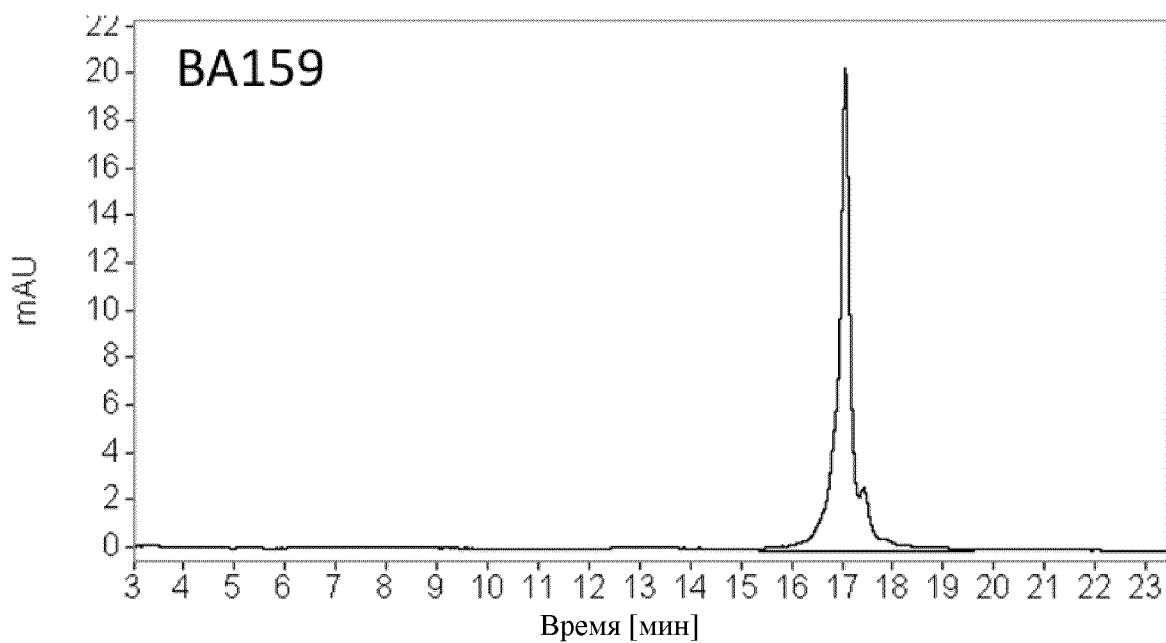
51. Способ по п. 50, где белок теплового шока представляет собой hsc70 и образует комплекс с опухолеассоциированным антигенным пептидом.

52. Способ по п. 50, где белок теплового шока представляет собой белок gp96 и образует комплекс с опухолеассоциированным антигенным пептидом, где необязательно HSPPC происходит из опухоли, полученной от субъекта.

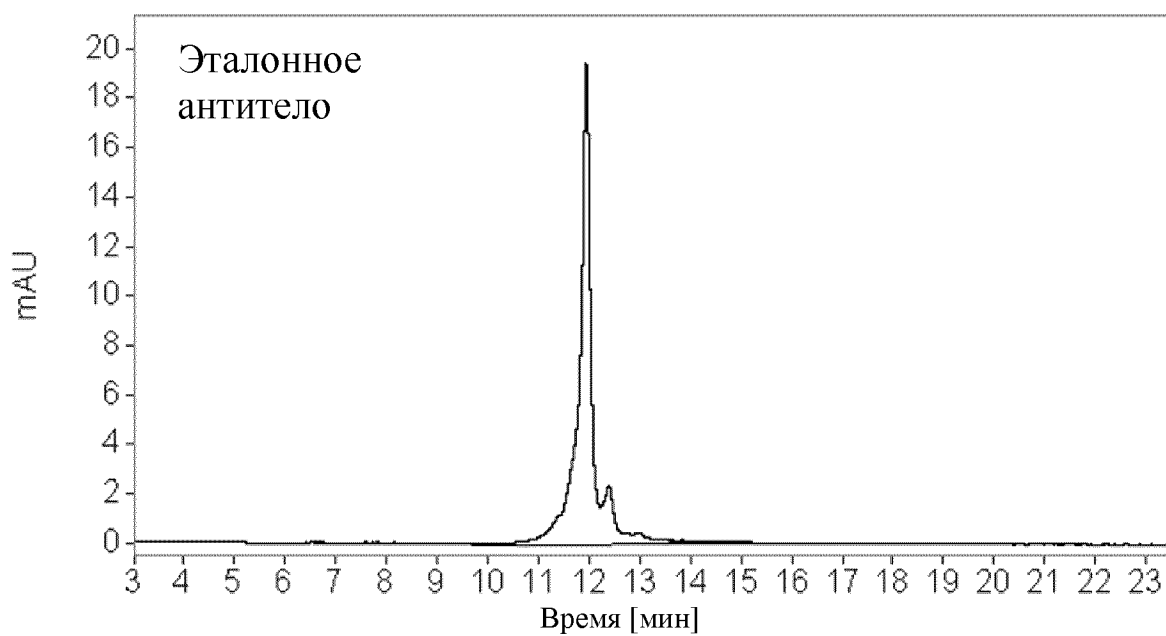
53. Способ лечения инфекционного заболевания у субъекта, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества выделенного антитела по любому из пп. 1-32, полинуклеотида по п. 33, вектора по п. 34, клетки-хозяина по п. 35 или фармацевтической композиции по п. 36.

По доверенности

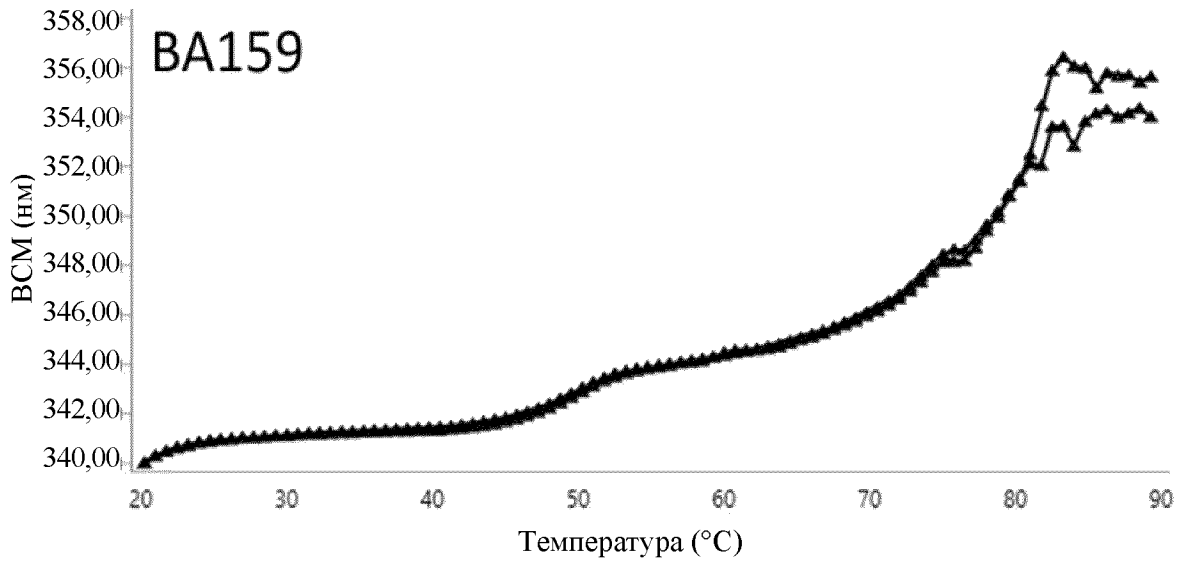
1/33



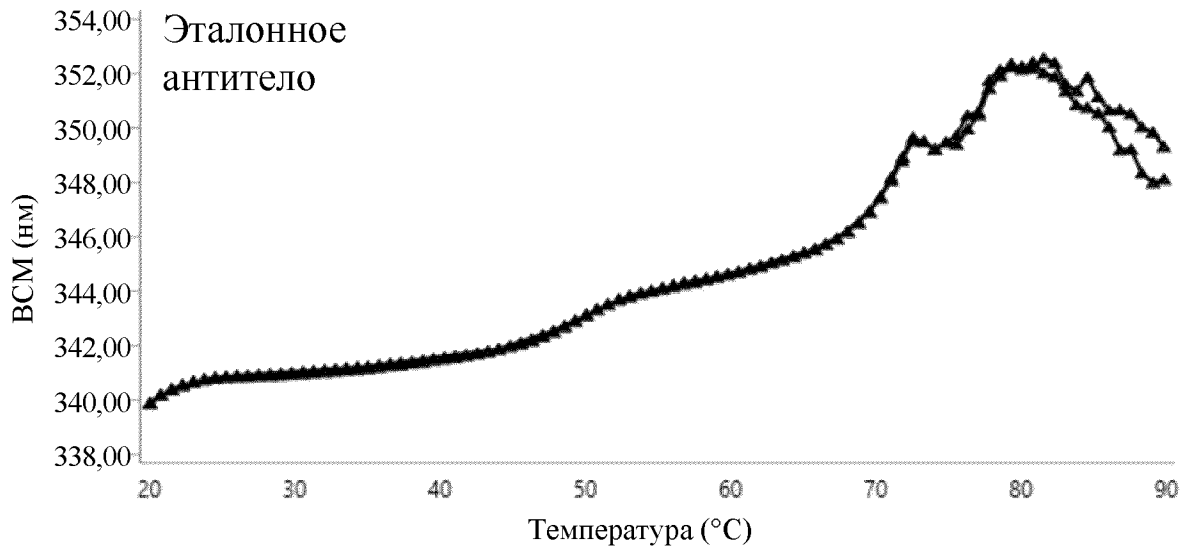
Фиг. 1А



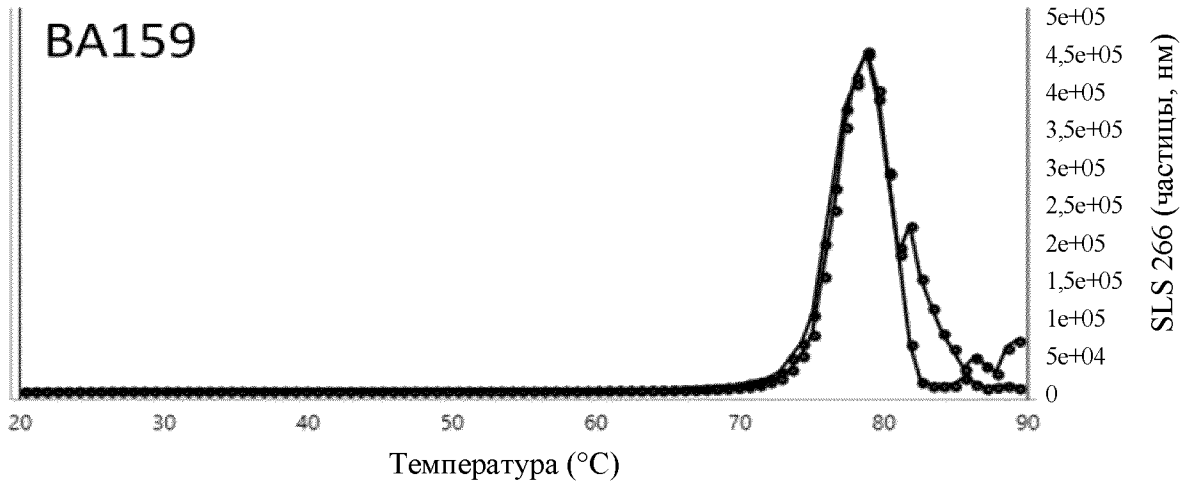
Фиг. 1В



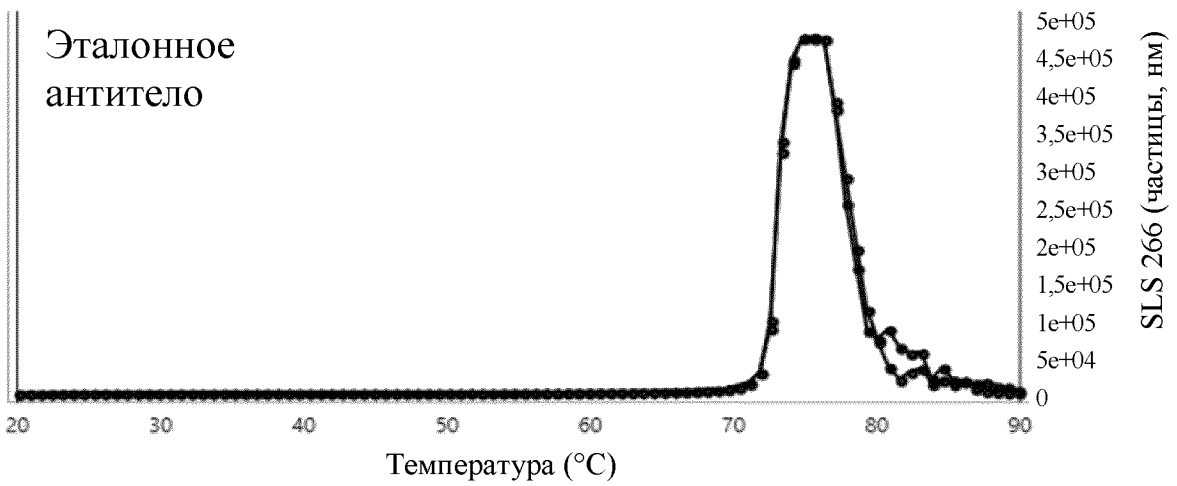
Фиг. 2А



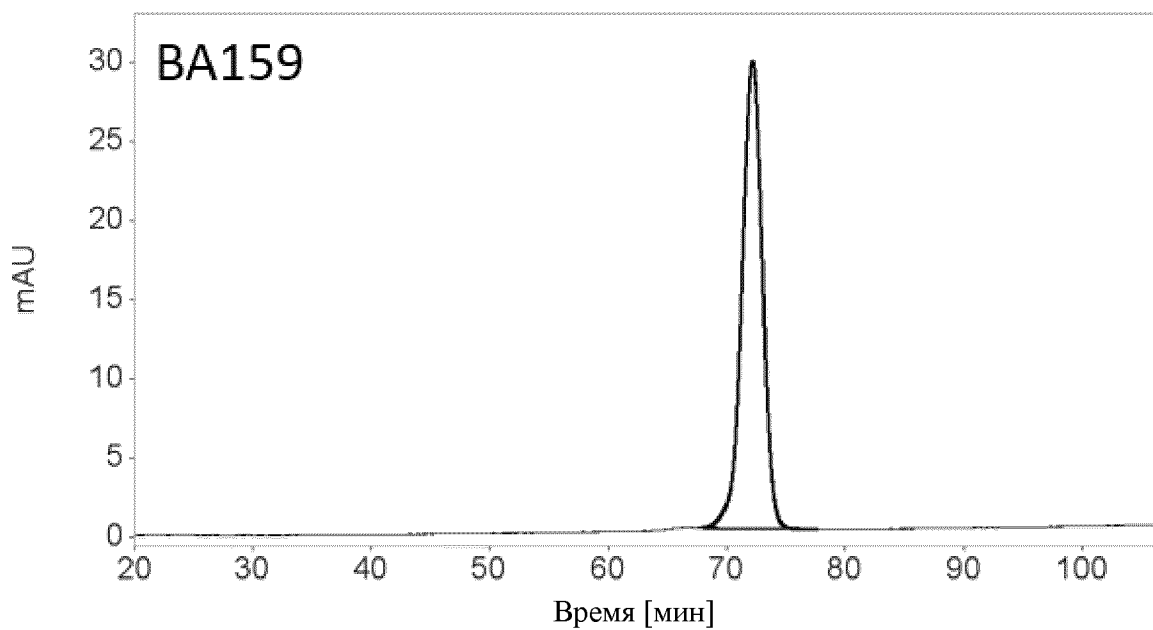
Фиг. 2В



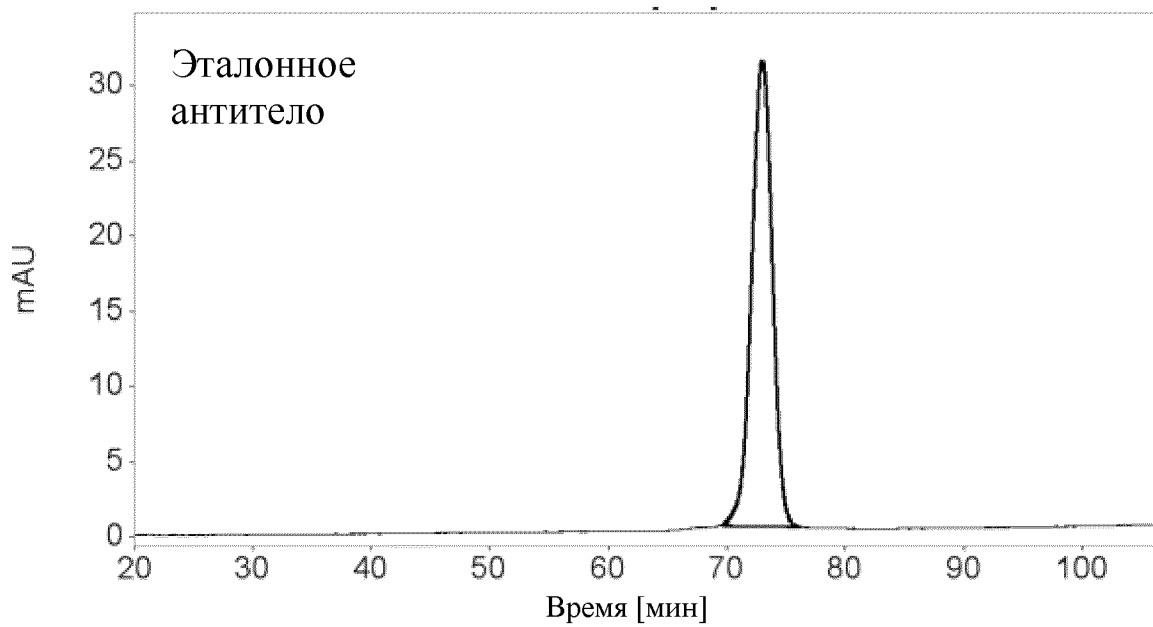
Фиг. 3А



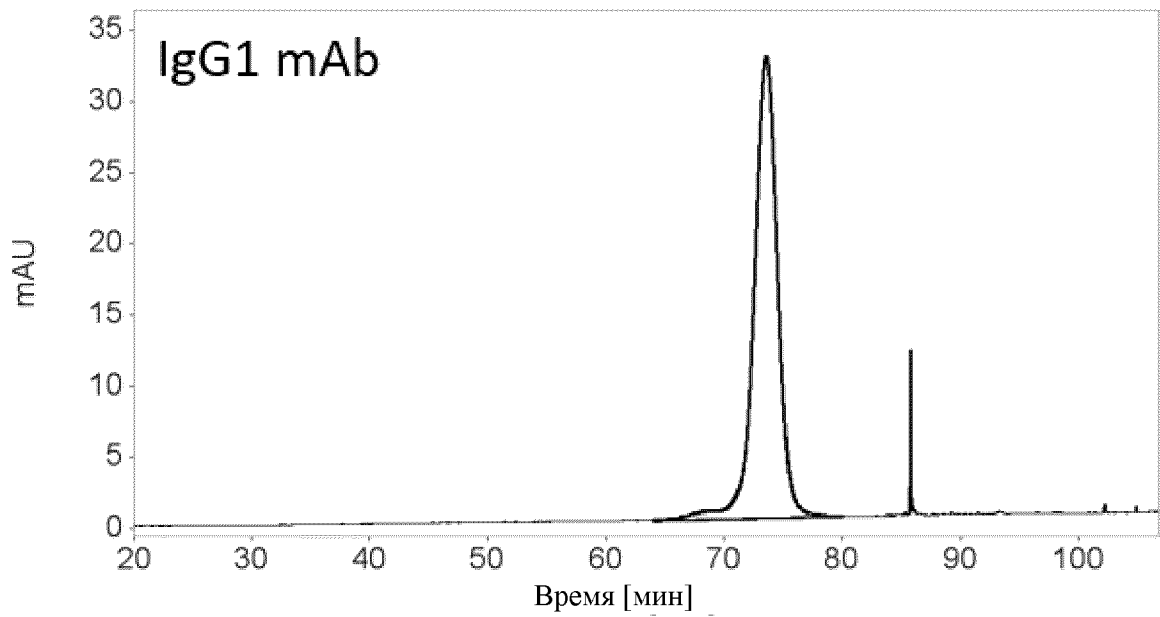
Фиг. 3В



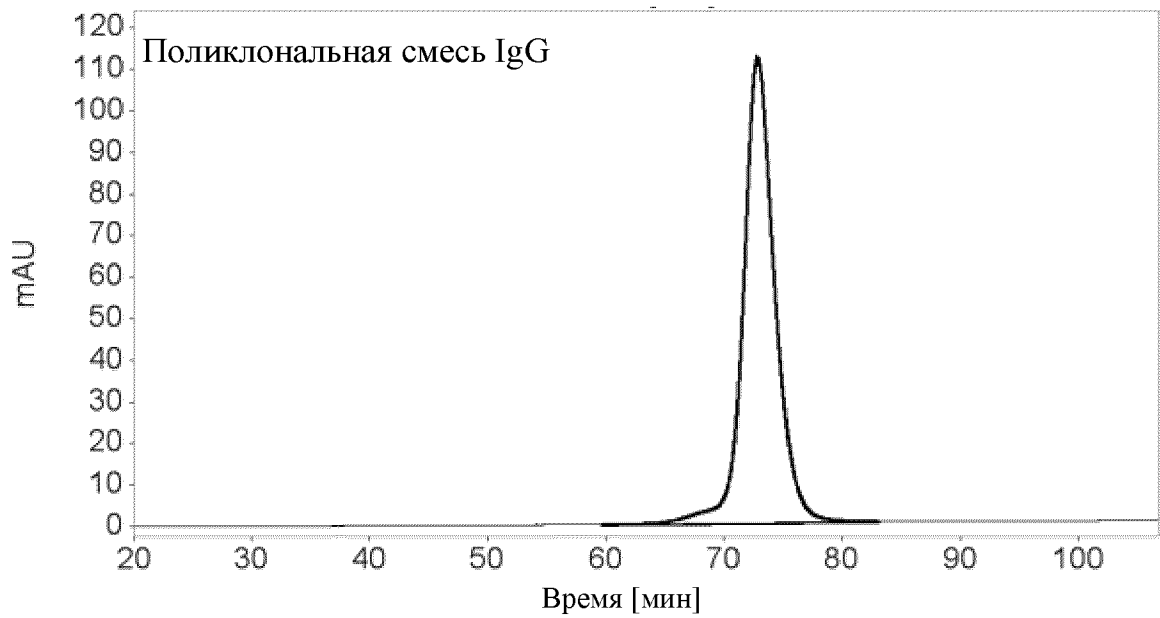
Фиг. 4А



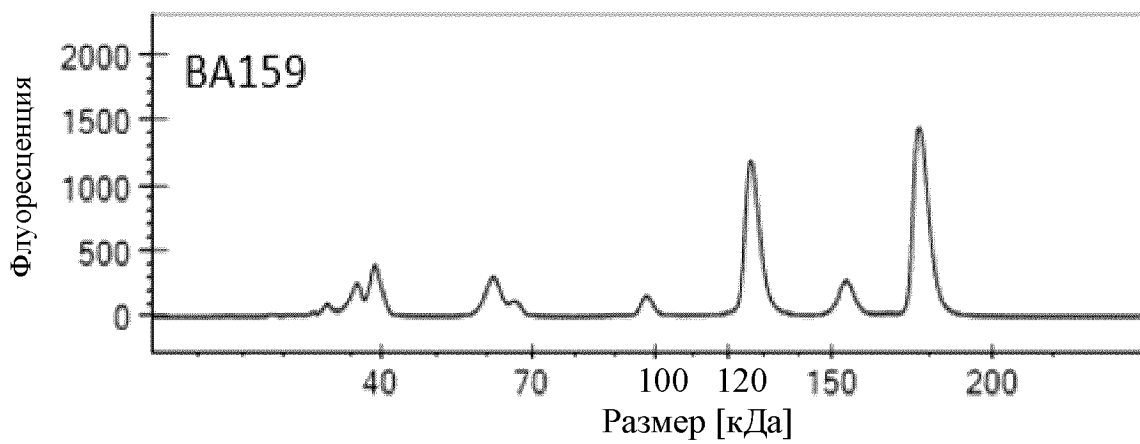
Фиг. 4В



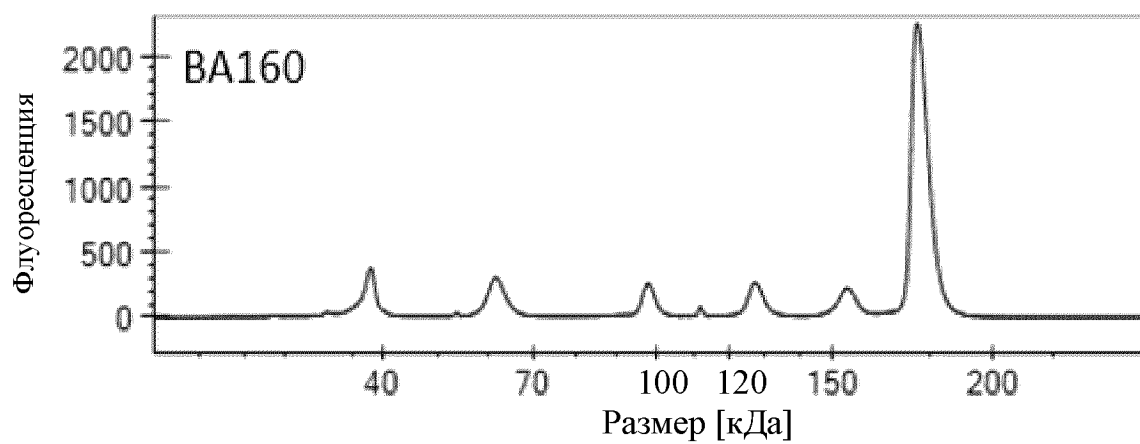
Фиг. 4С



Фиг. 4D

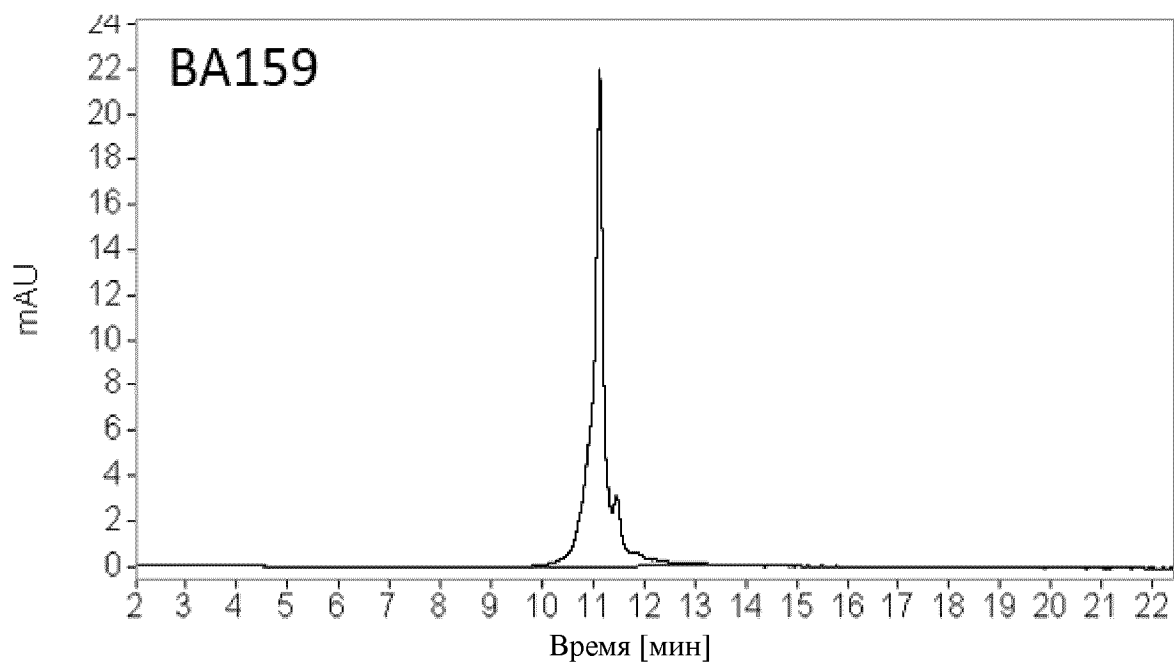


Фиг. 5А

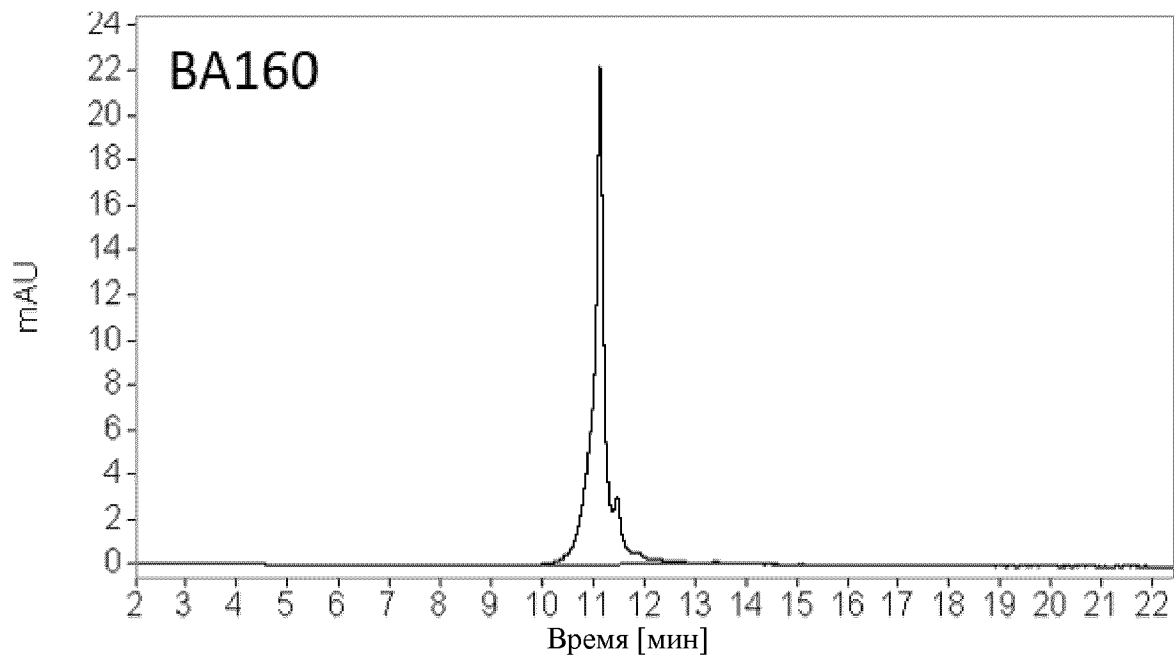


Фиг. 5В

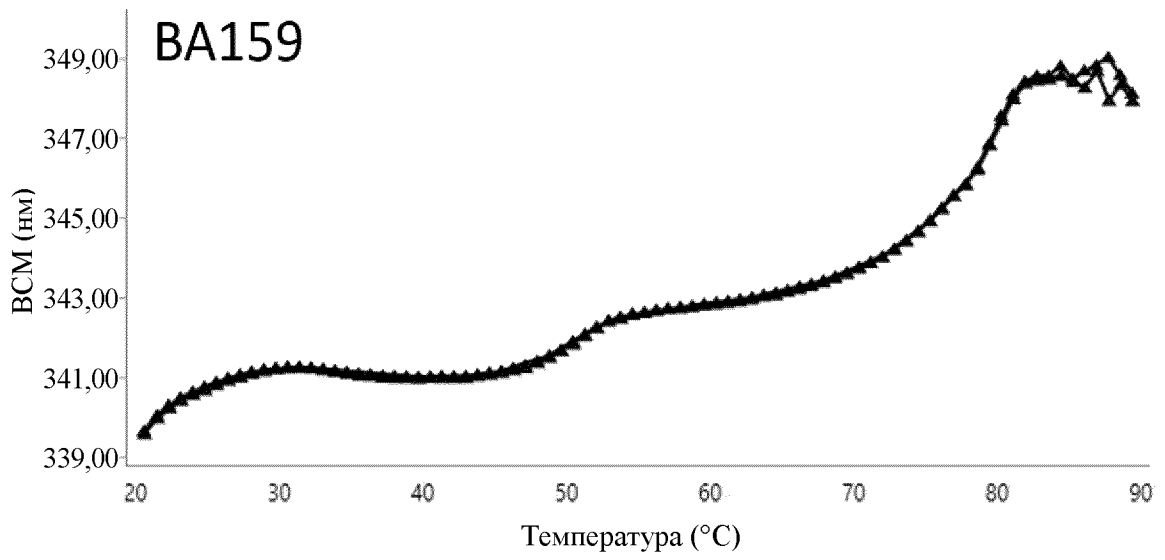
7/33



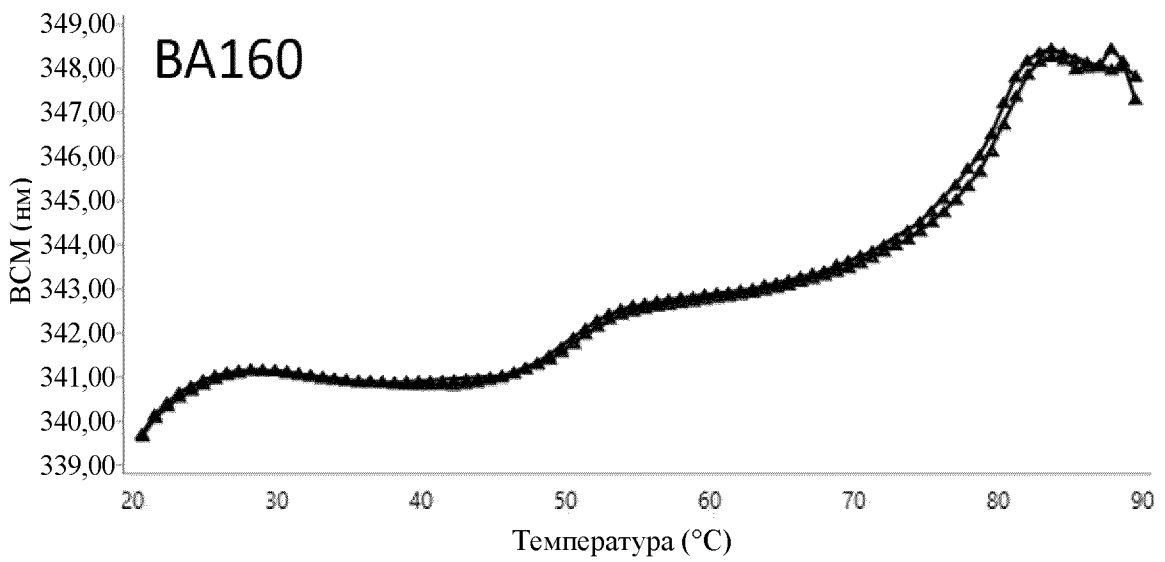
Фиг. 6А



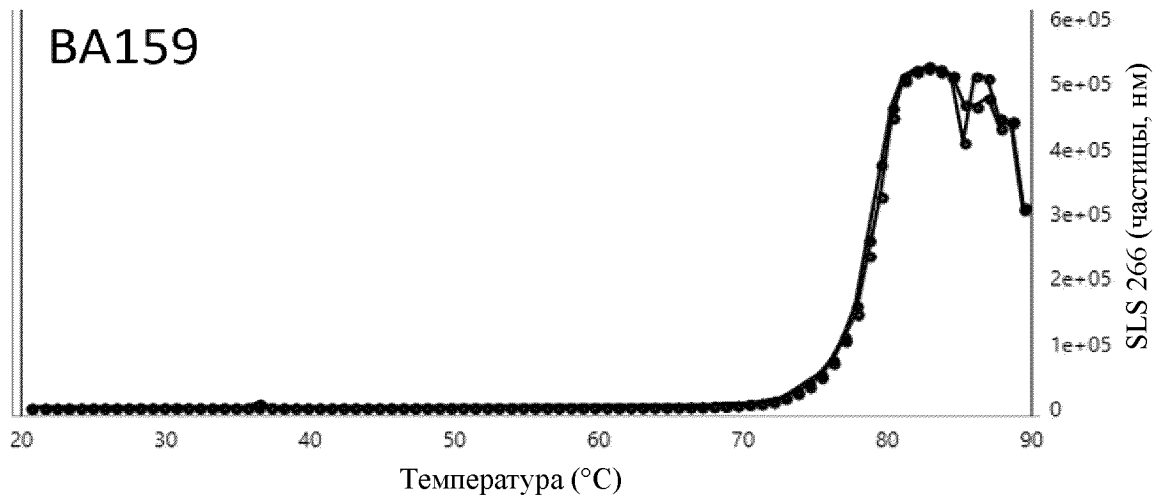
Фиг. 6В



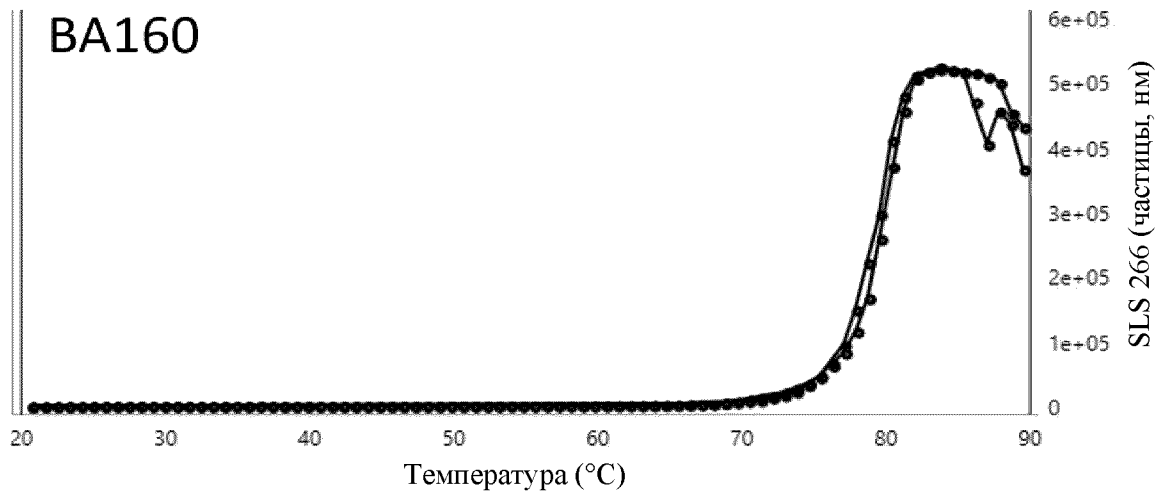
Фиг. 7А



Фиг. 7В

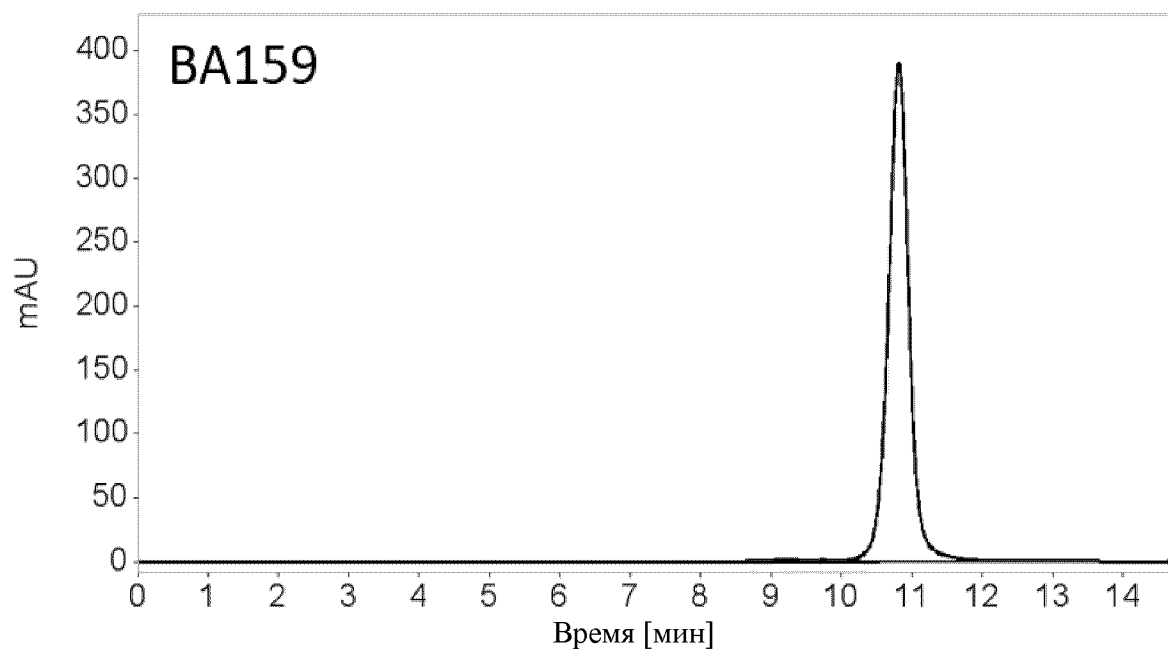


Фиг. 8А

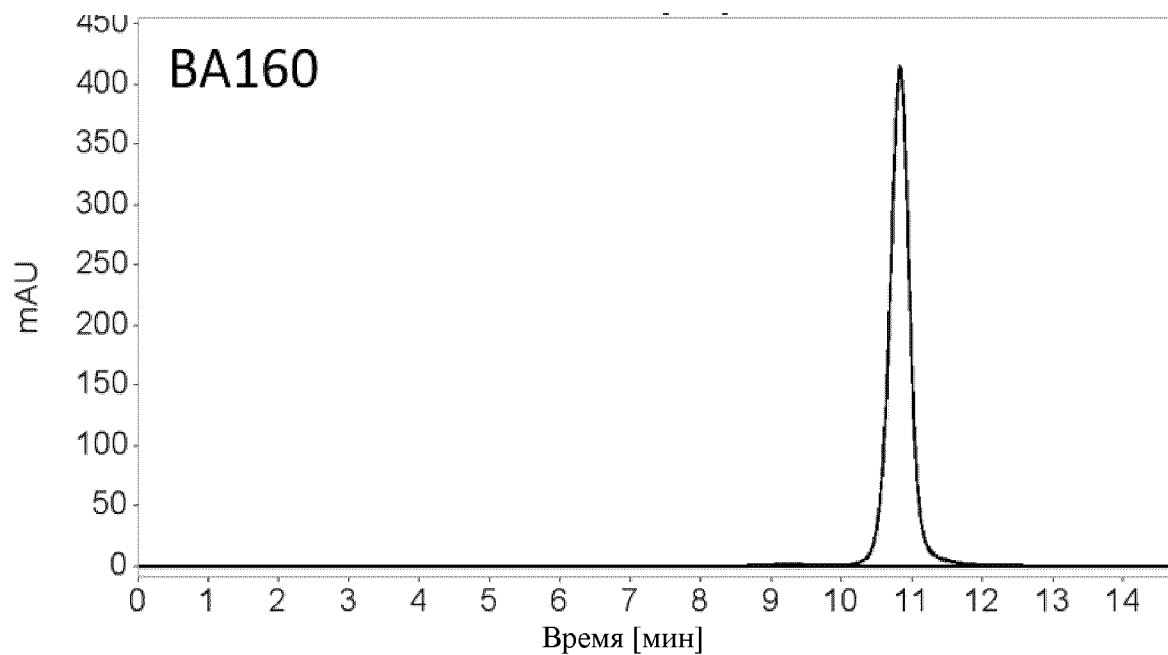


Фиг. 8В

10/33

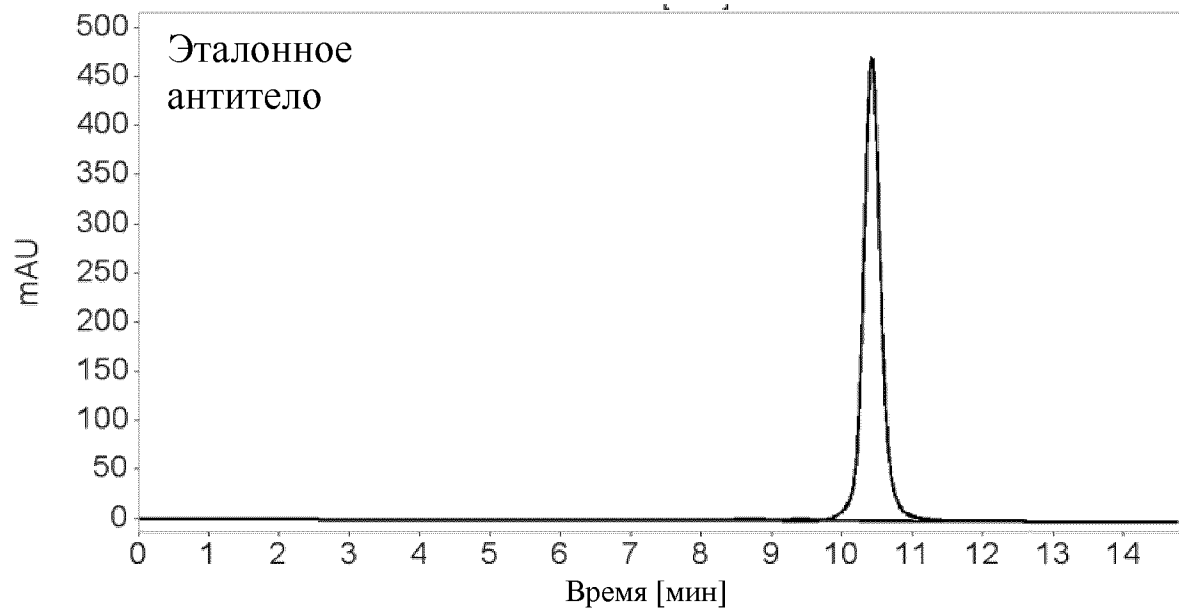


Фиг. 9А

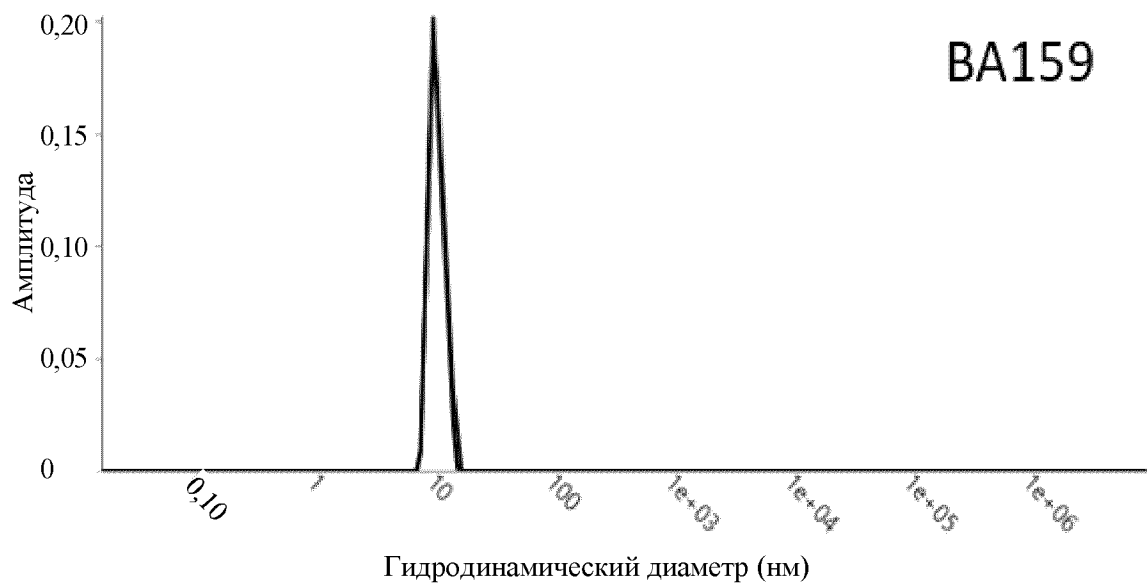


Фиг. 9В

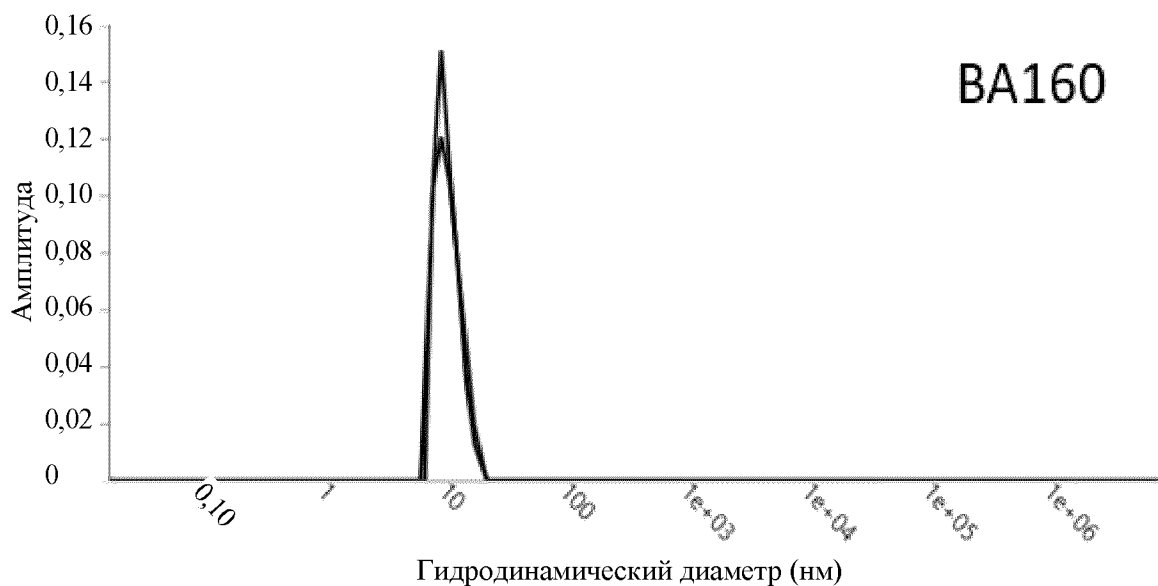
11/33



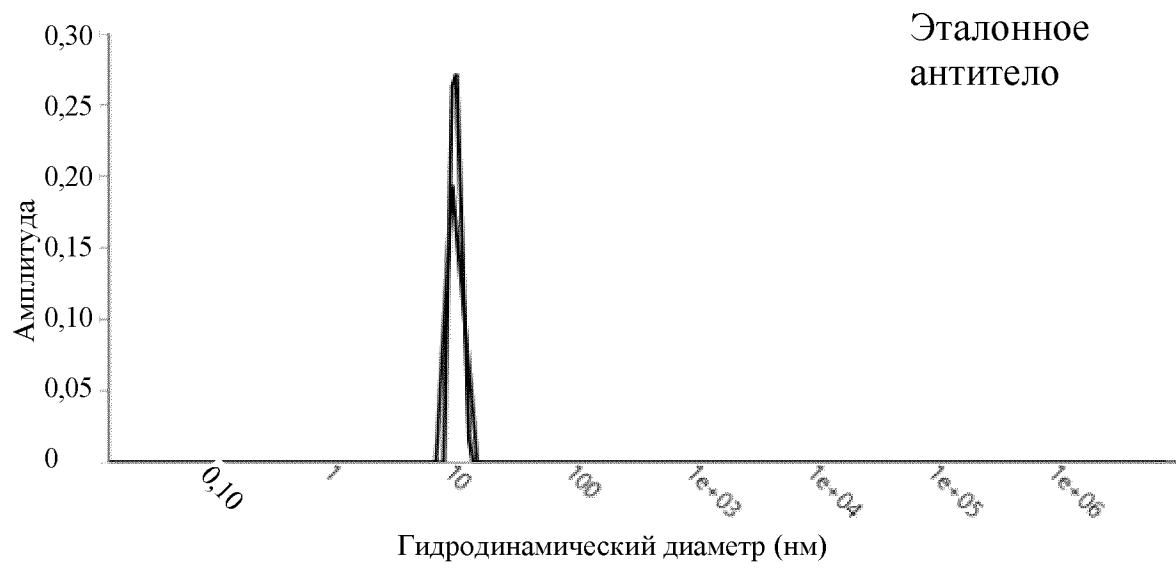
Фиг. 9С



Фиг. 10А

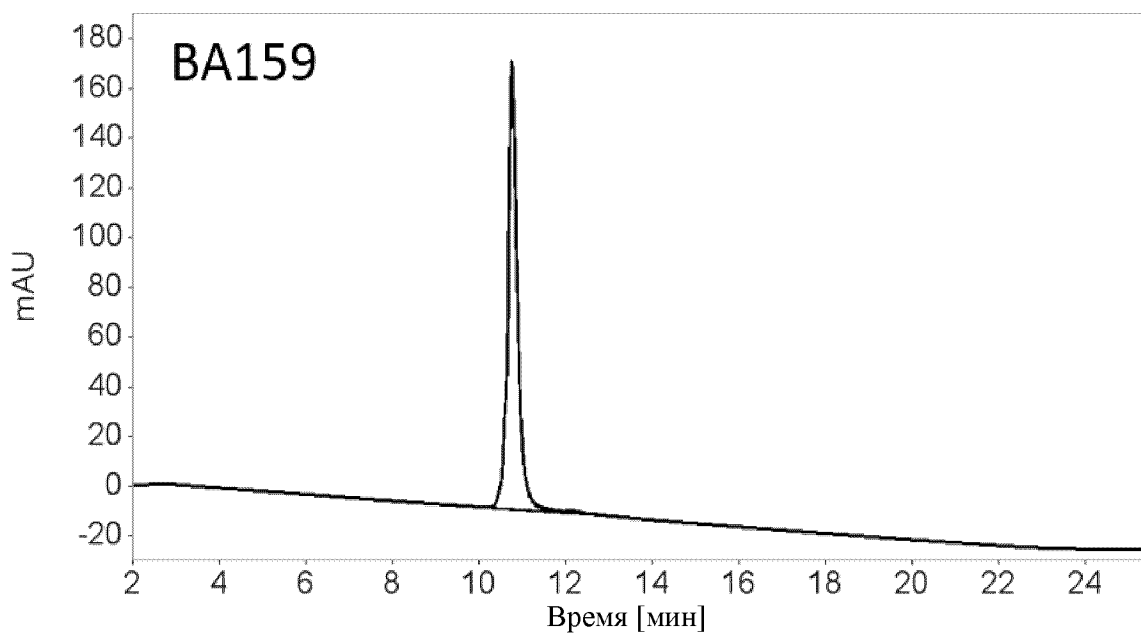


Фиг. 10В

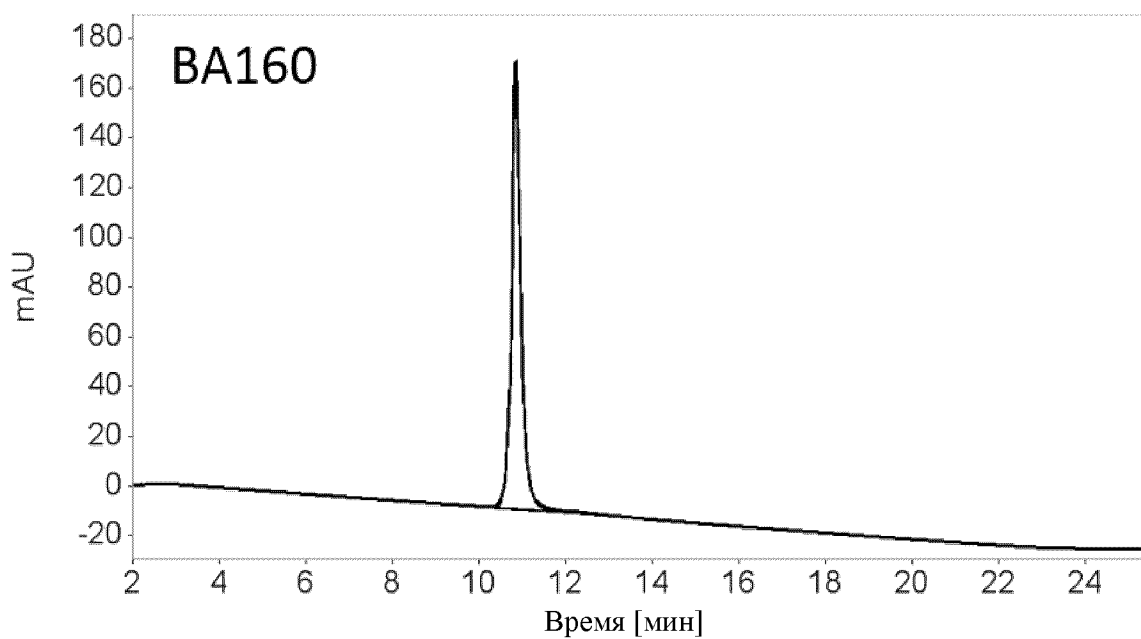


Фиг. 10С

14/33

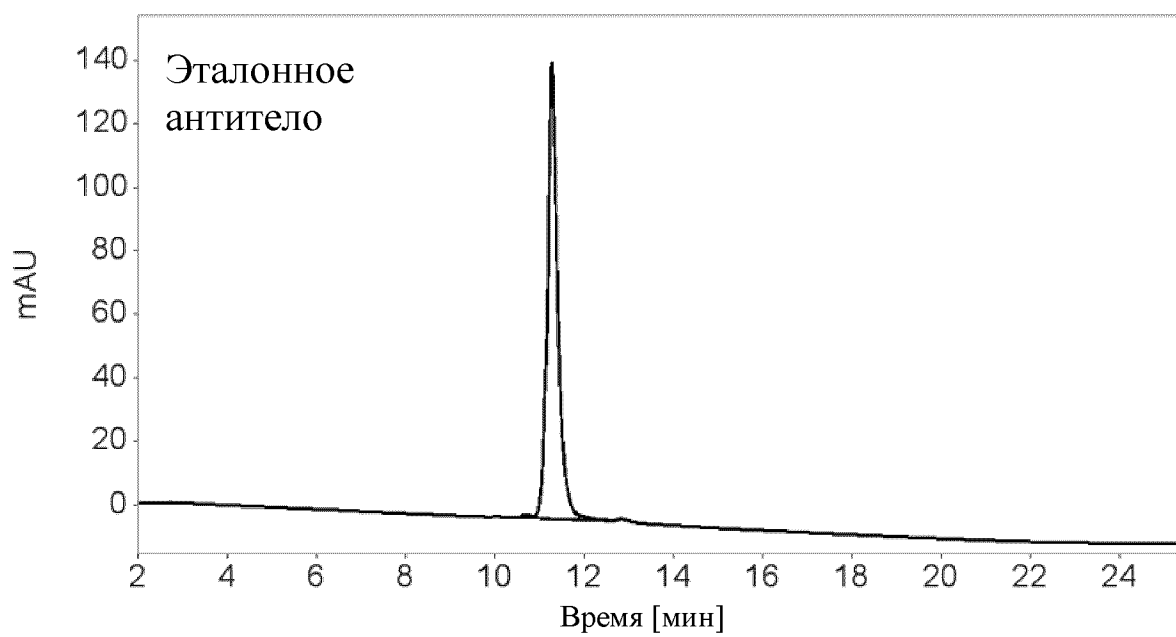


Фиг. 11А



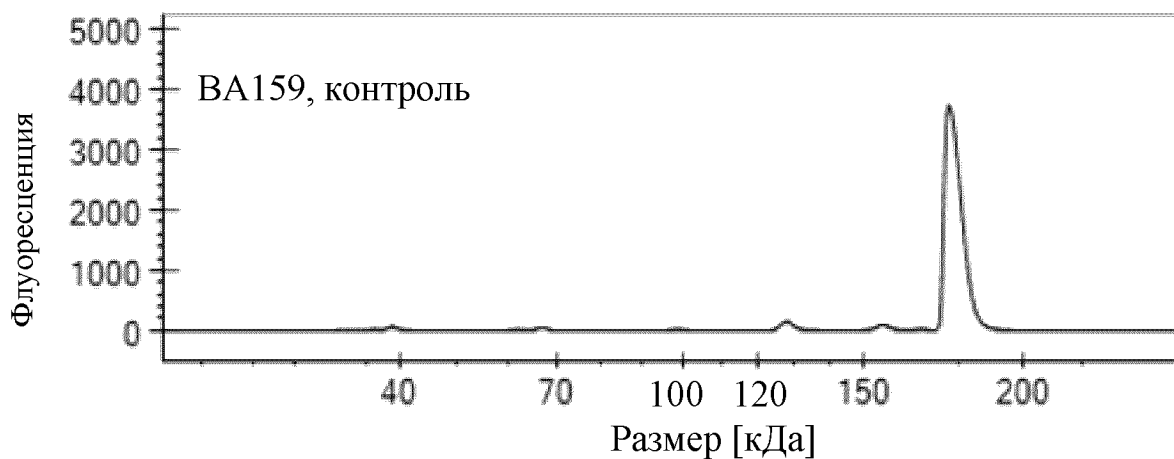
Фиг. 11В

15/33

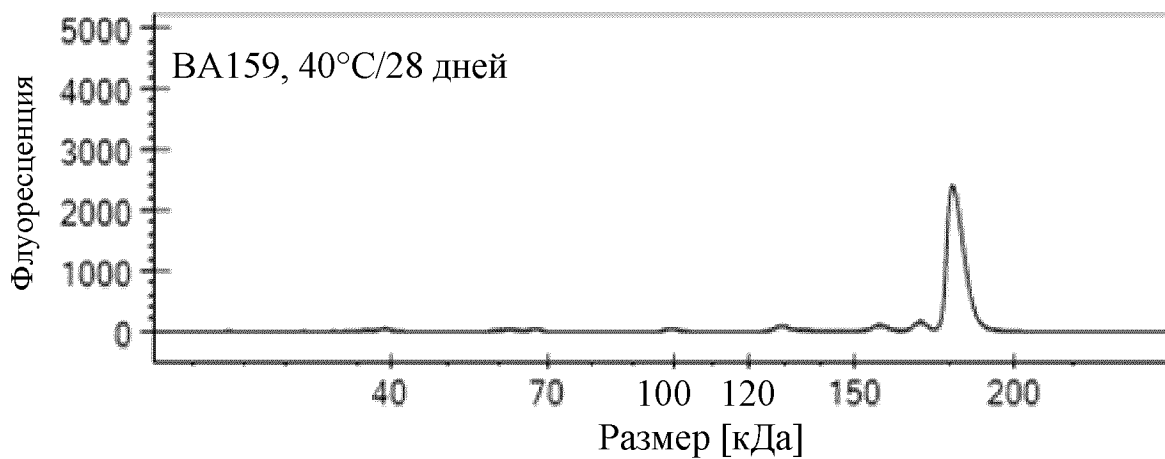


Фиг. 11С

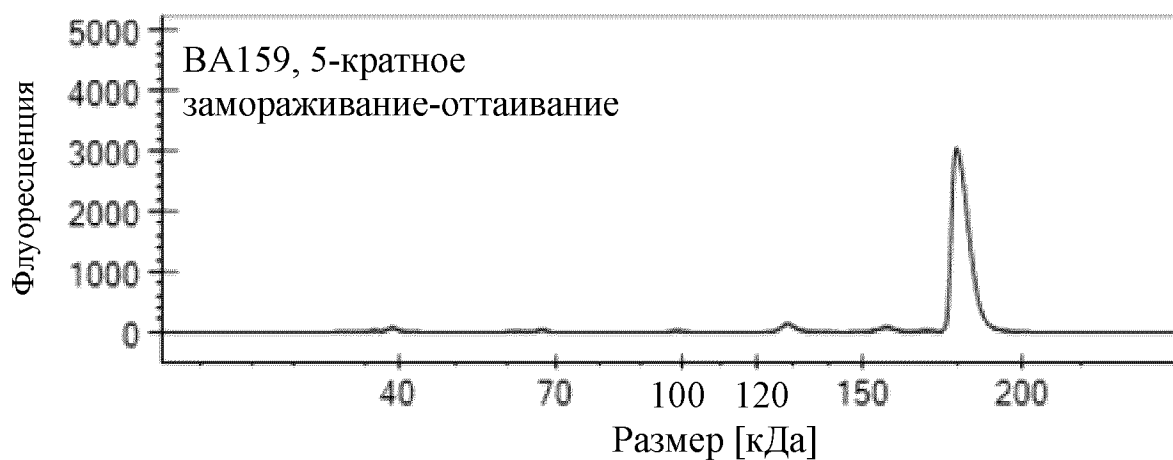
16/33



Фиг. 12А

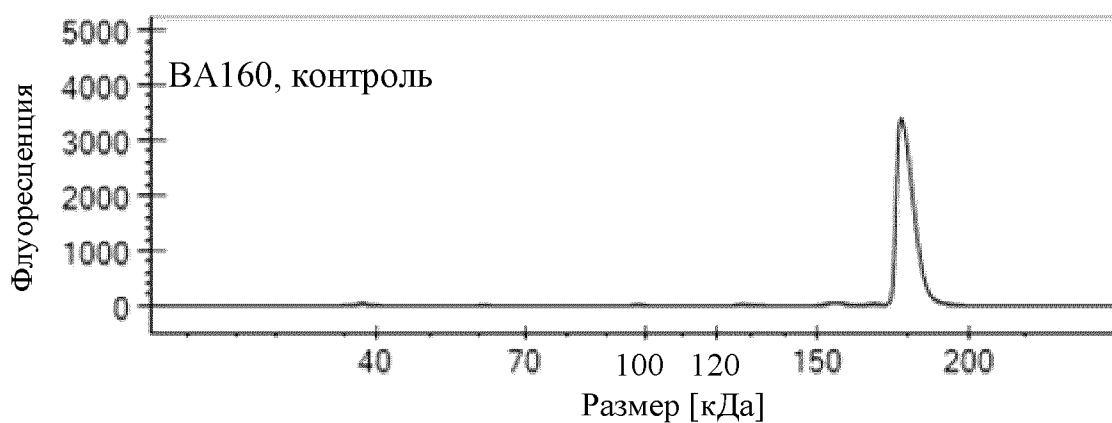


Фиг. 12В

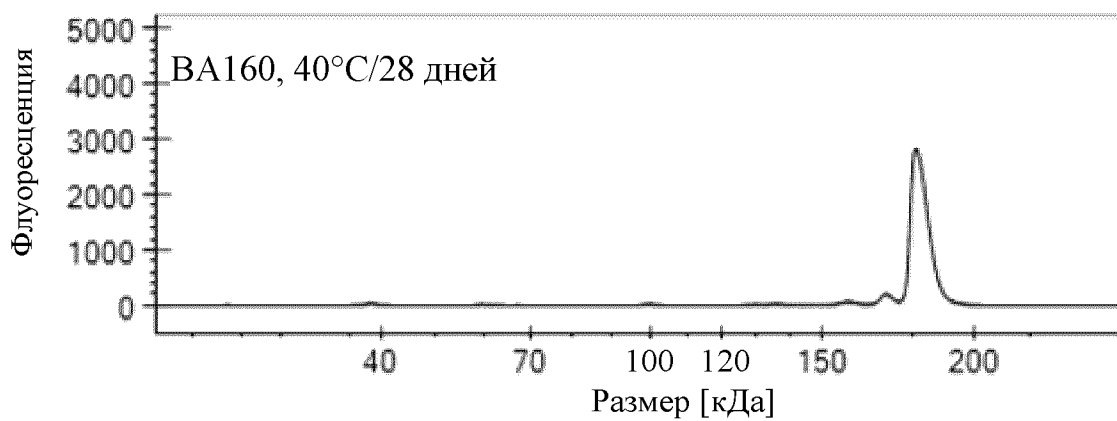


Фиг. 12С

17/33



Фиг. 12D

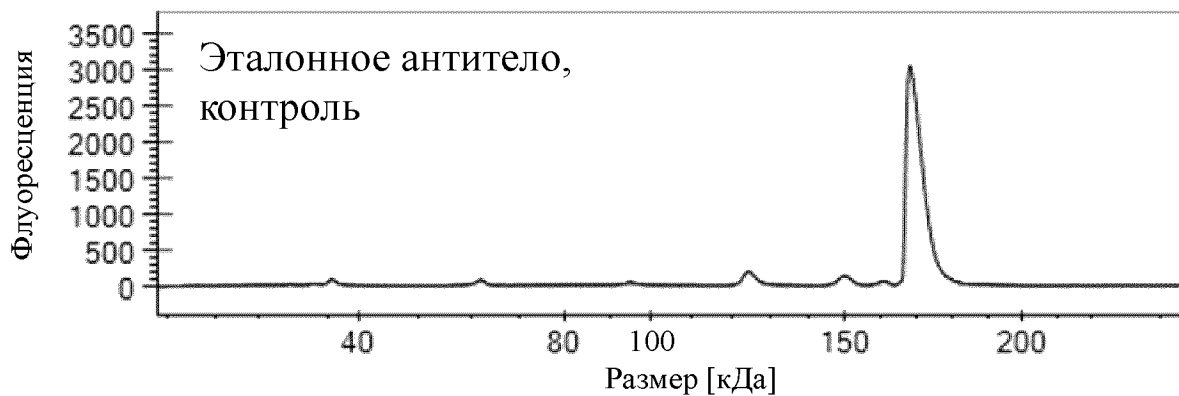


Фиг. 12E

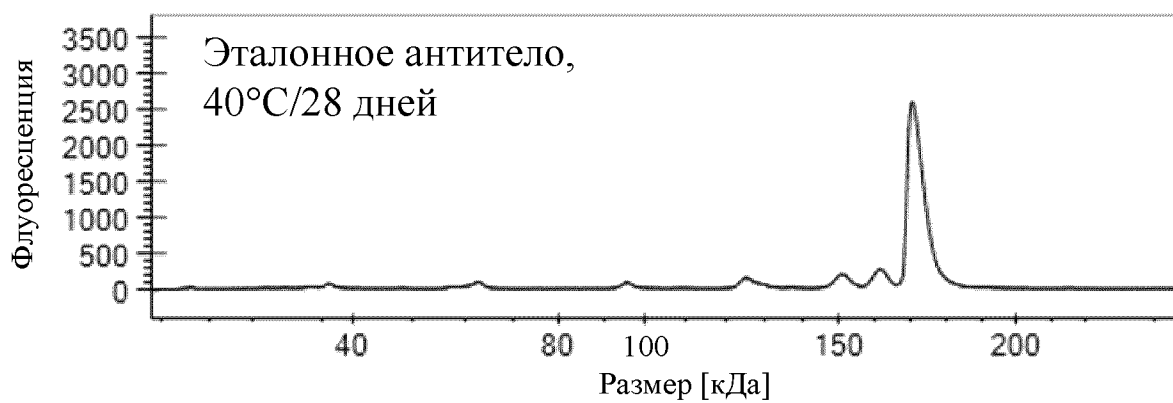


Фиг. 12F

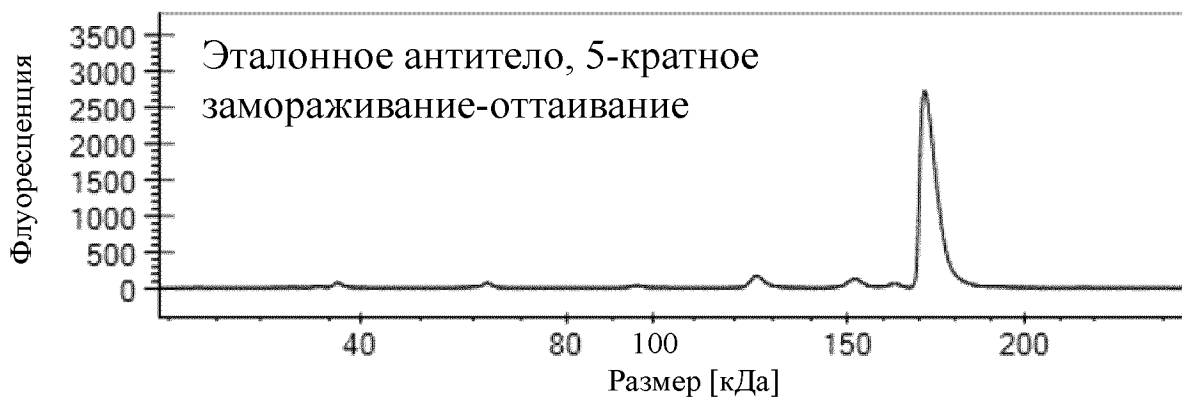
18/33



Фиг. 12G

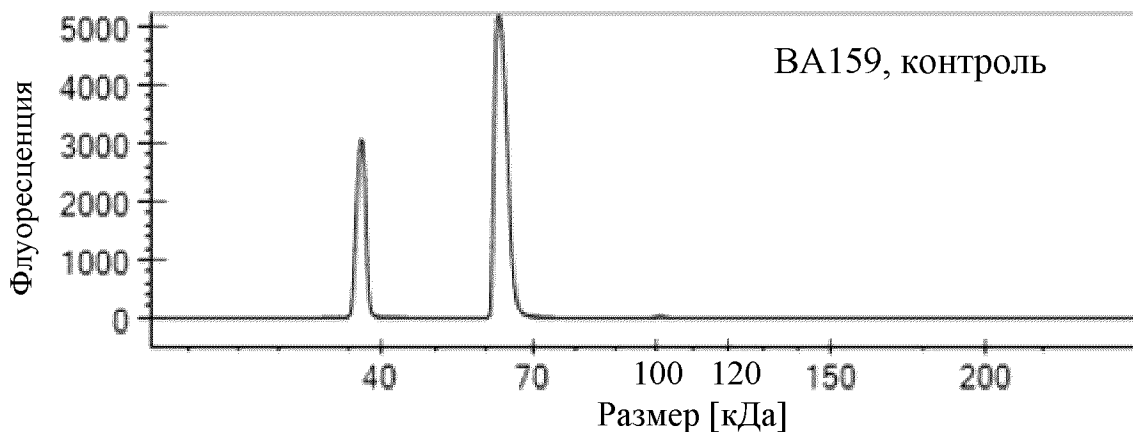


Фиг. 12H

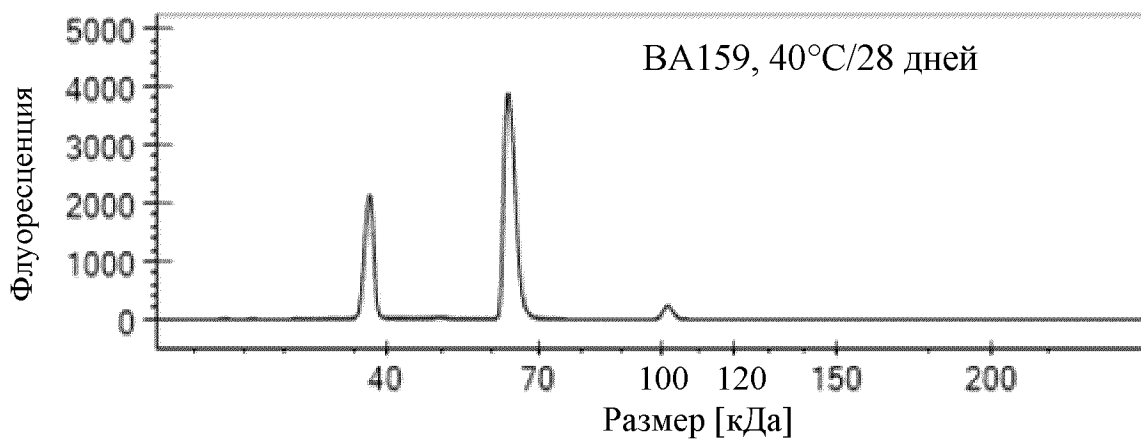


Фиг. 12I

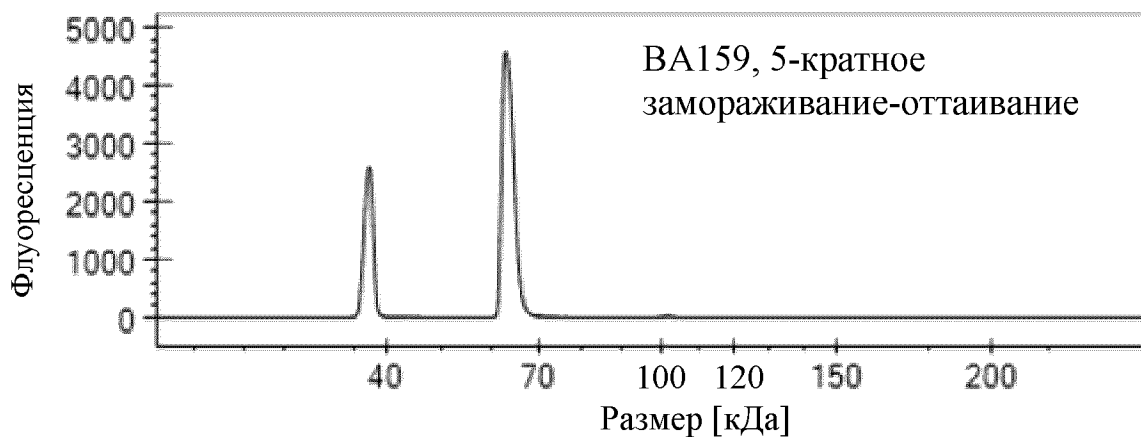
19/33



Фиг. 13А

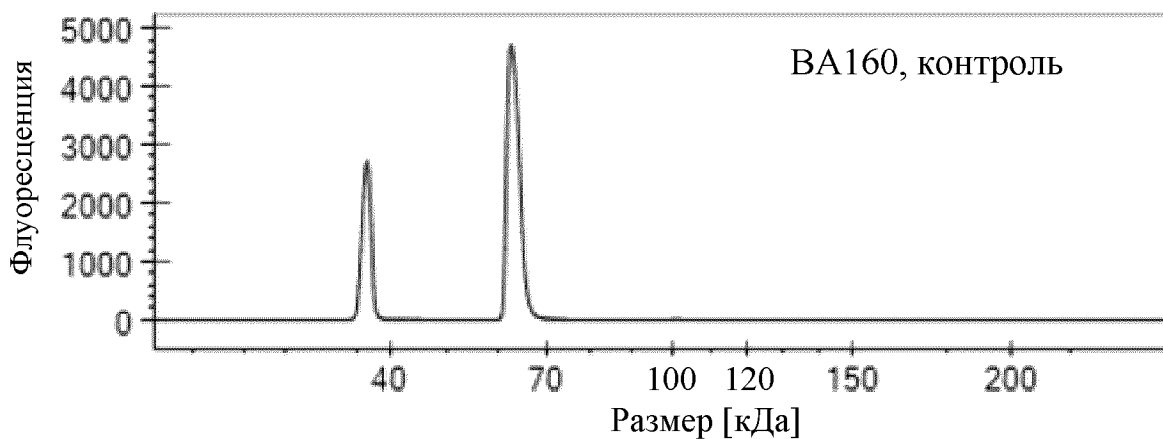


Фиг. 13В

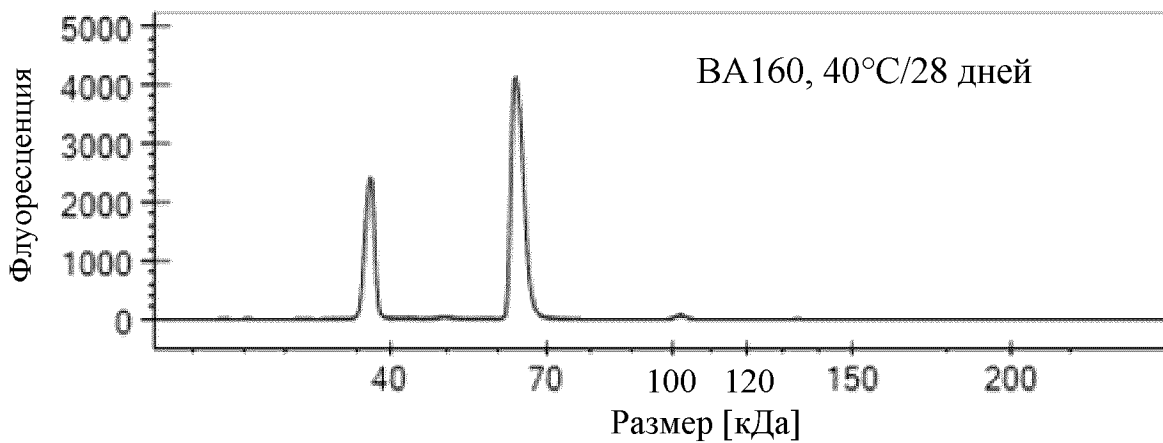


Фиг. 13С

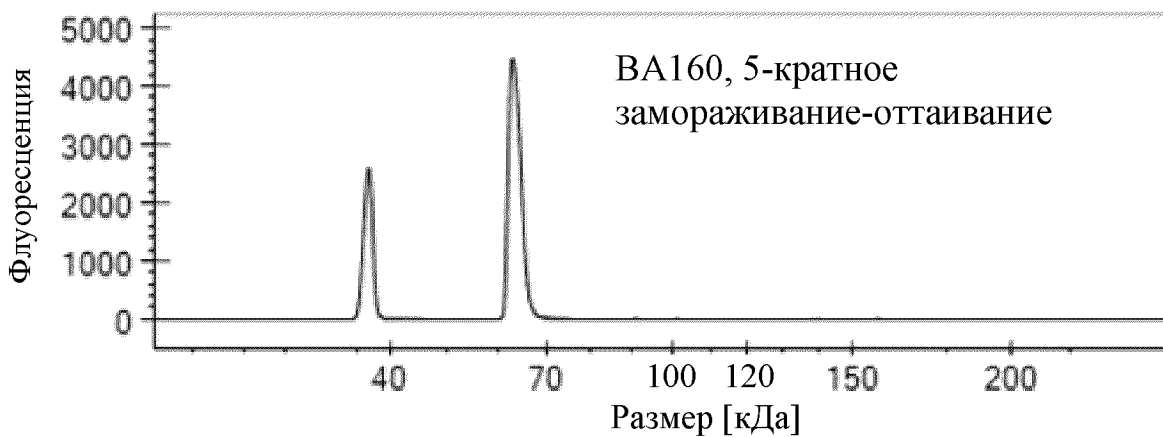
20/33



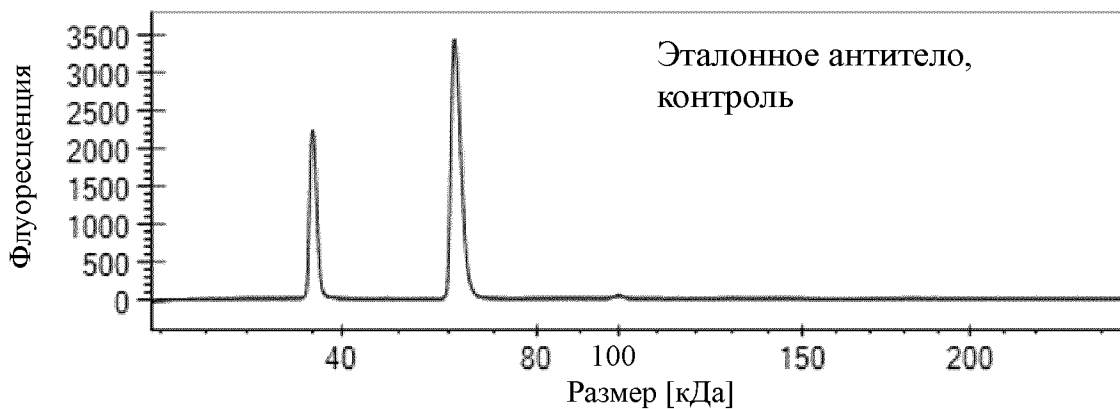
Фиг. 13D



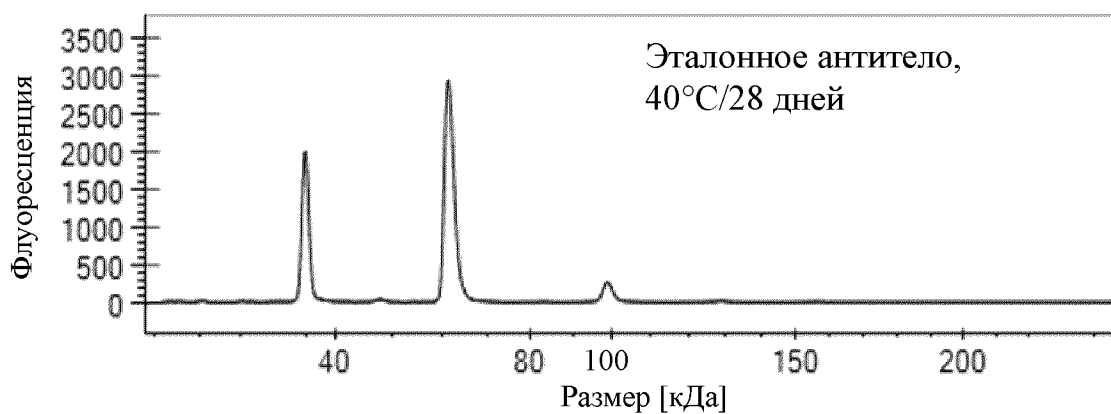
Фиг. 13E



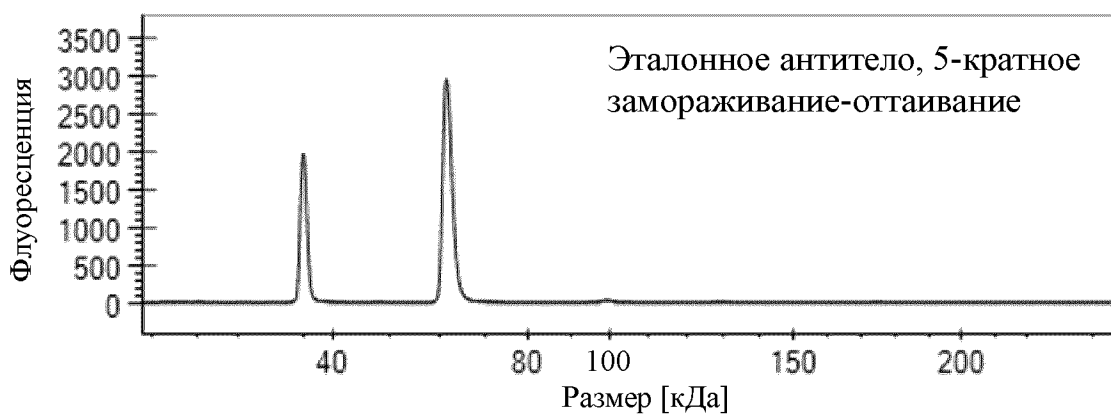
Фиг. 13F



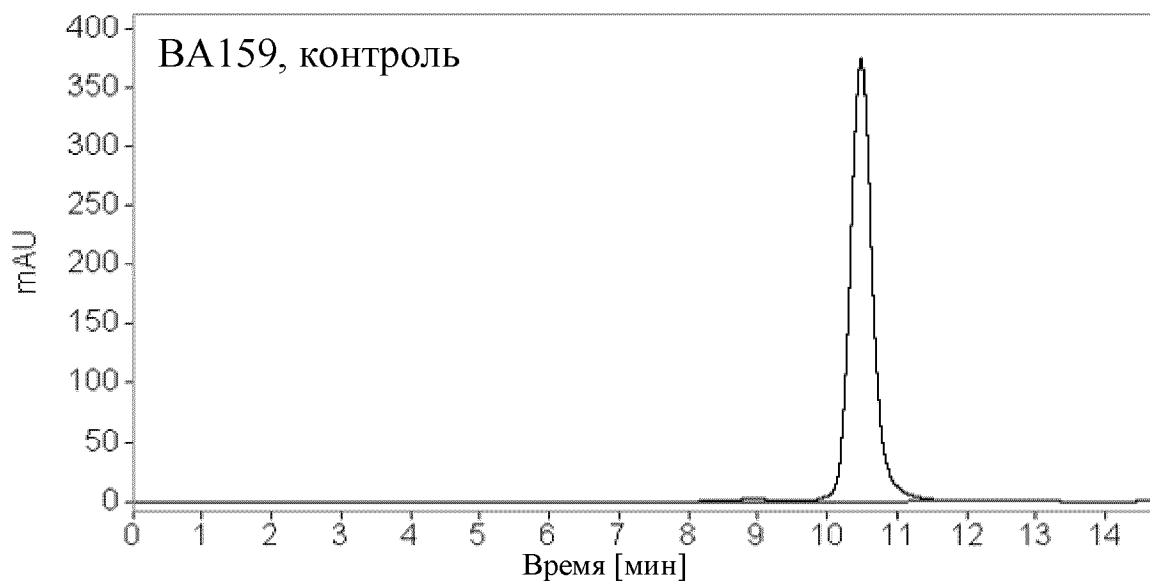
Фиг. 13G



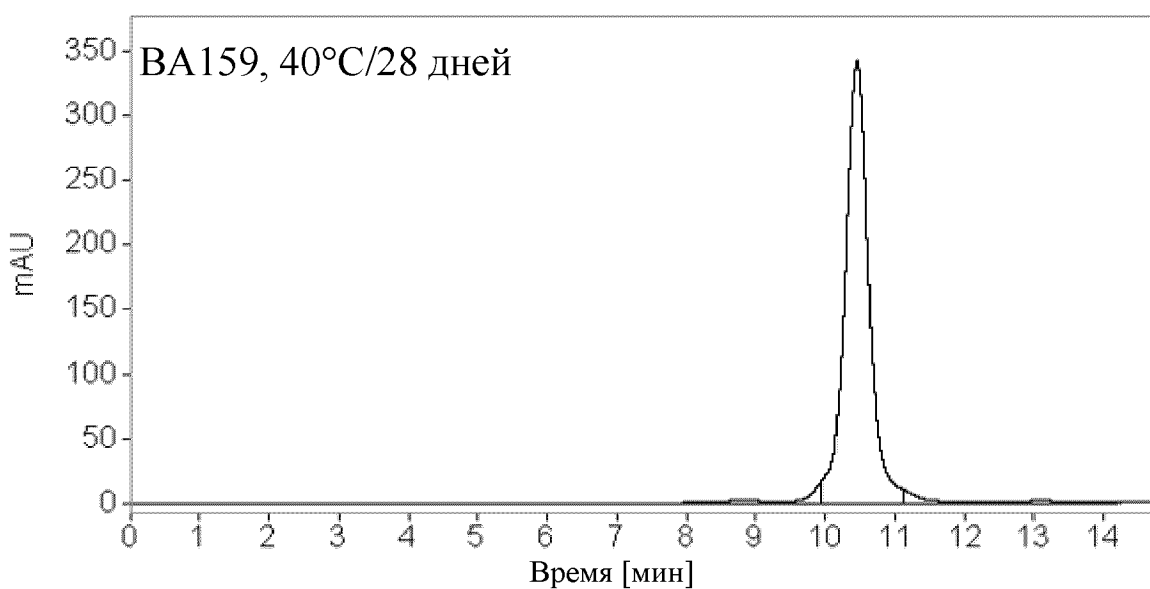
Фиг. 13H



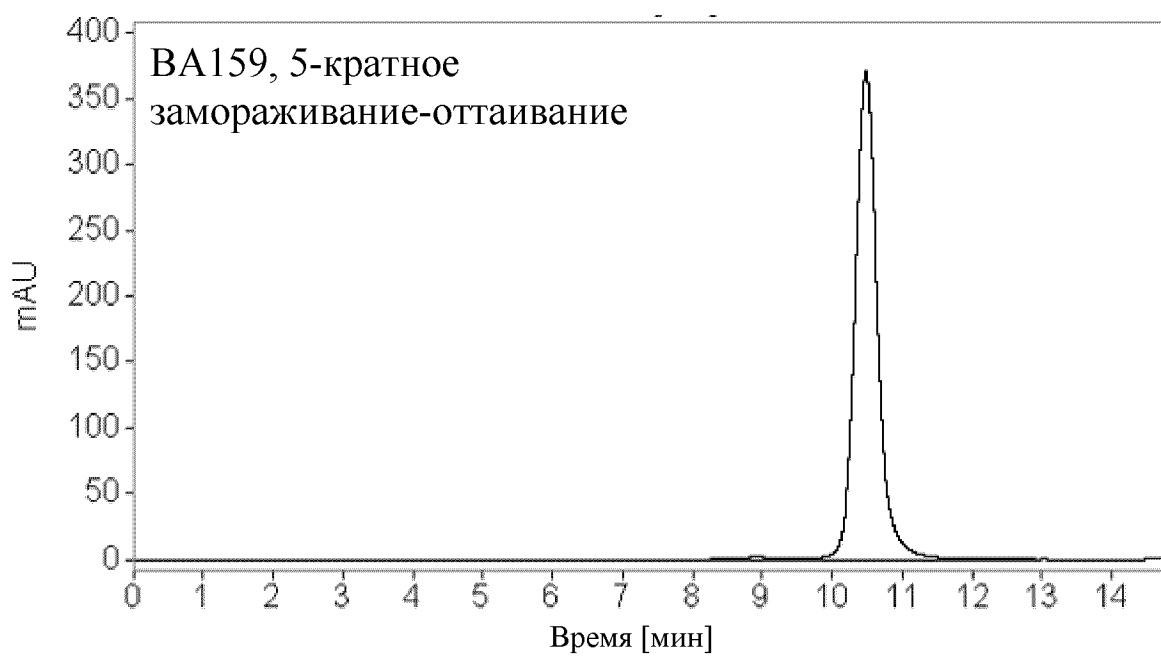
Фиг. 13I



Фиг. 14А

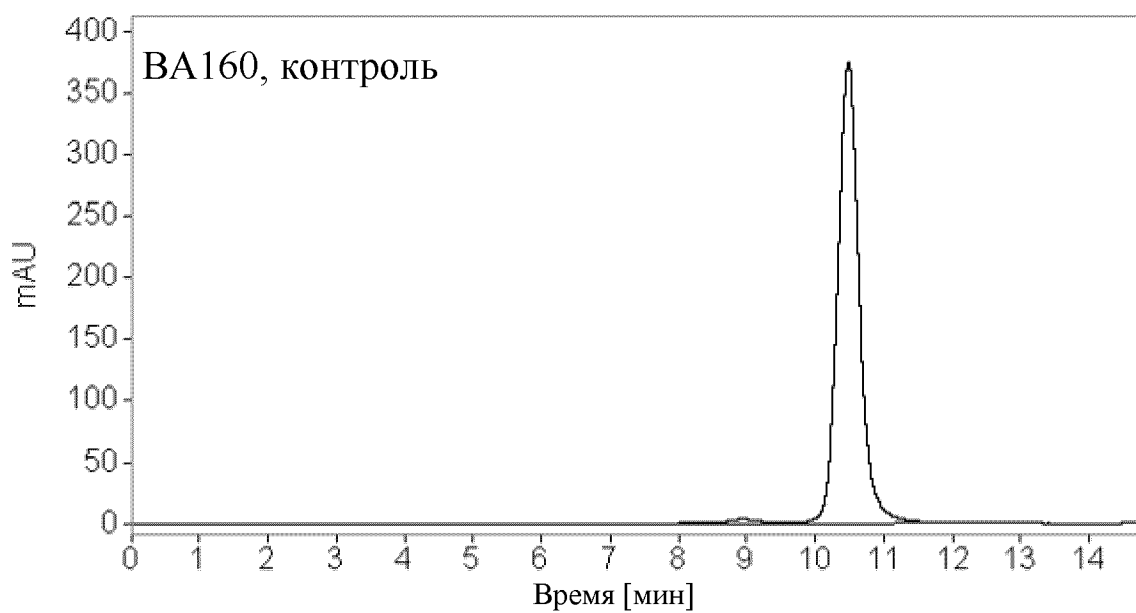


Фиг. 14В

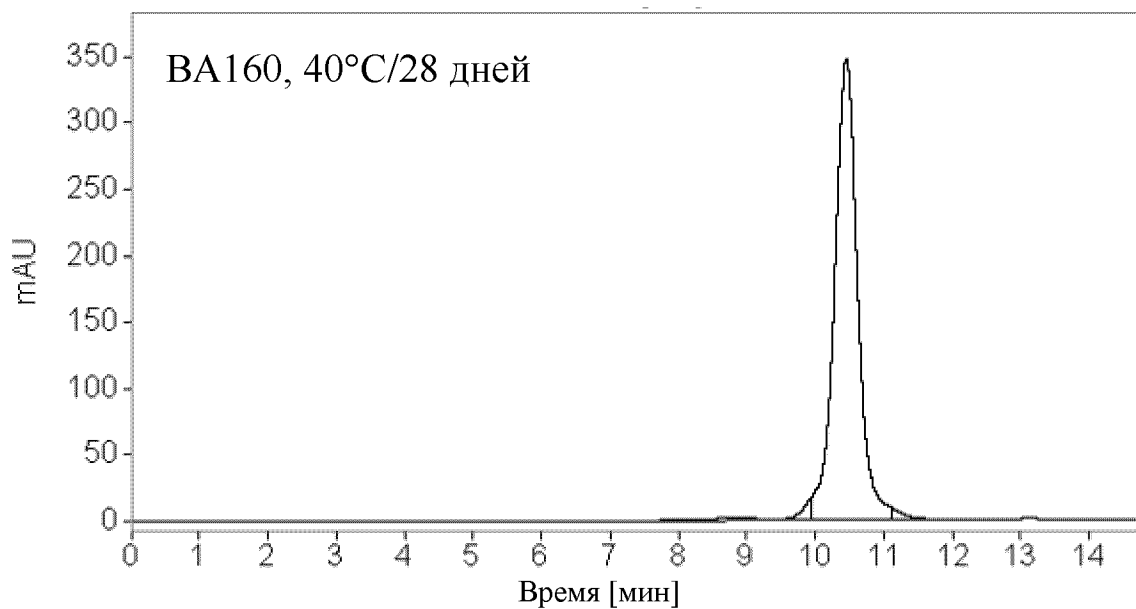


Фиг. 14С

24/33

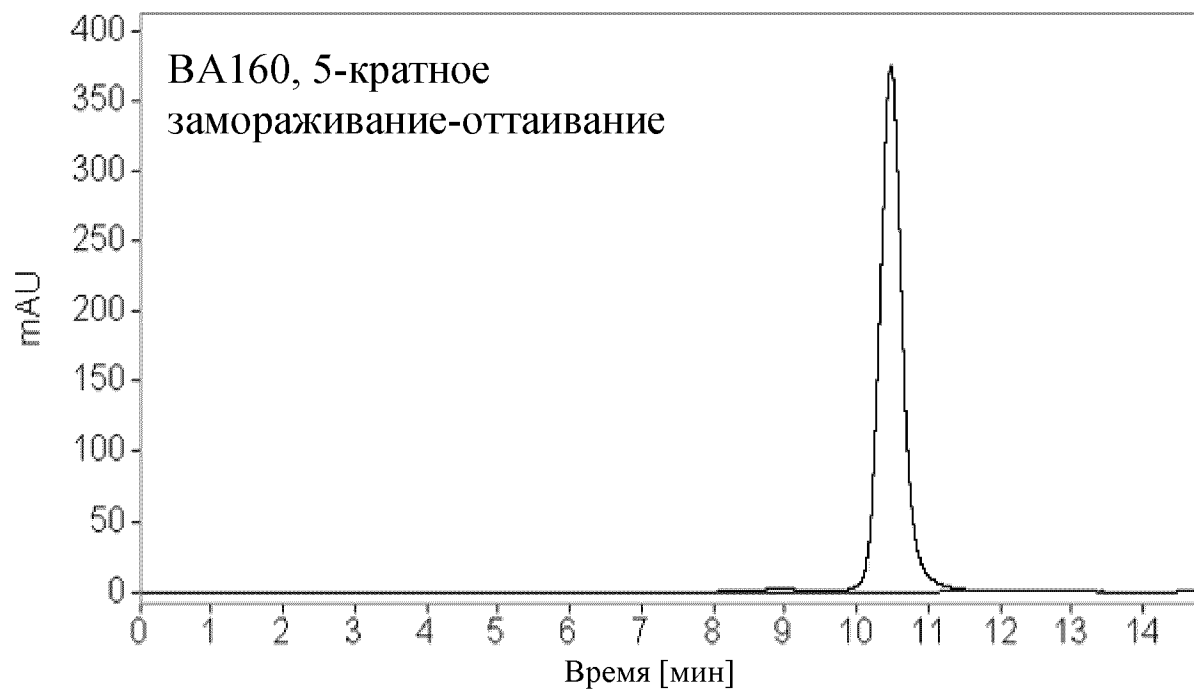


Фиг. 14D



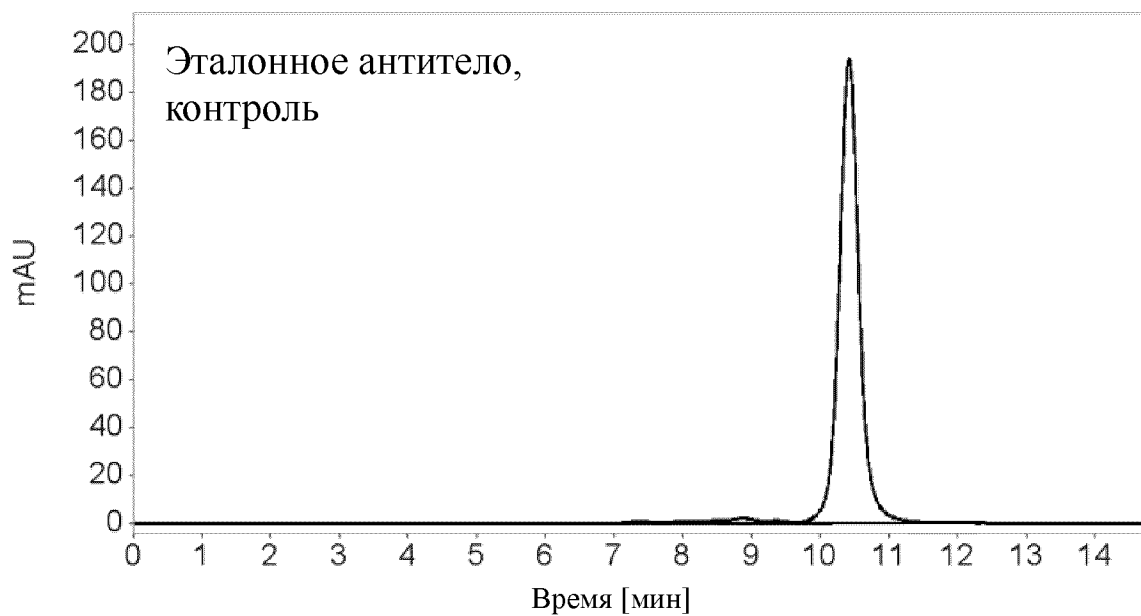
Фиг. 14E

25/33

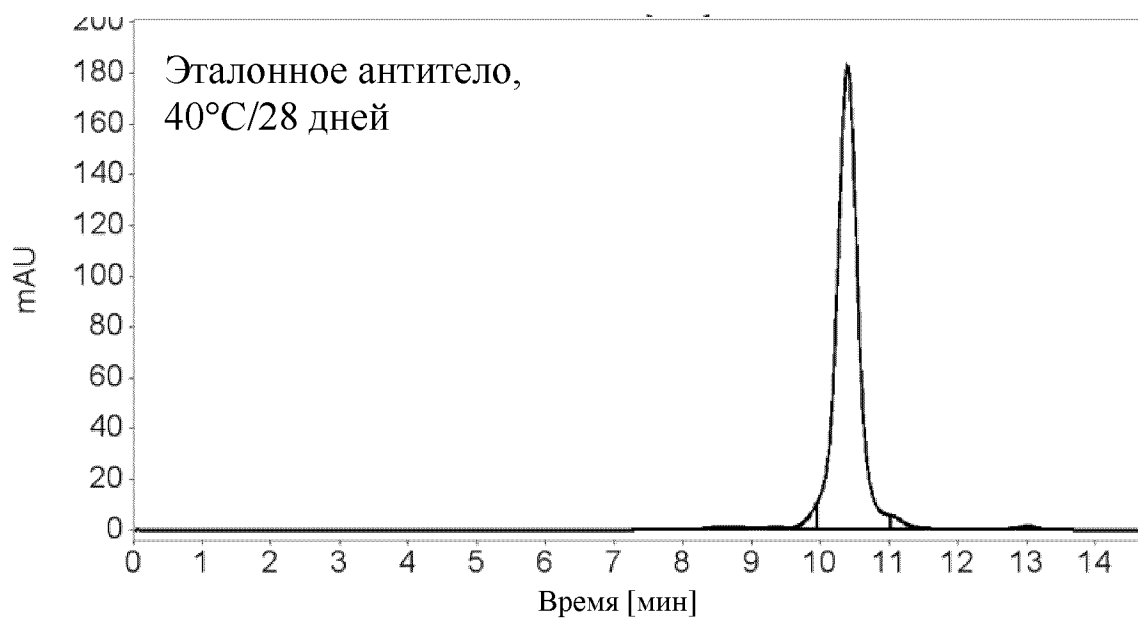


Фиг. 14F

26/33

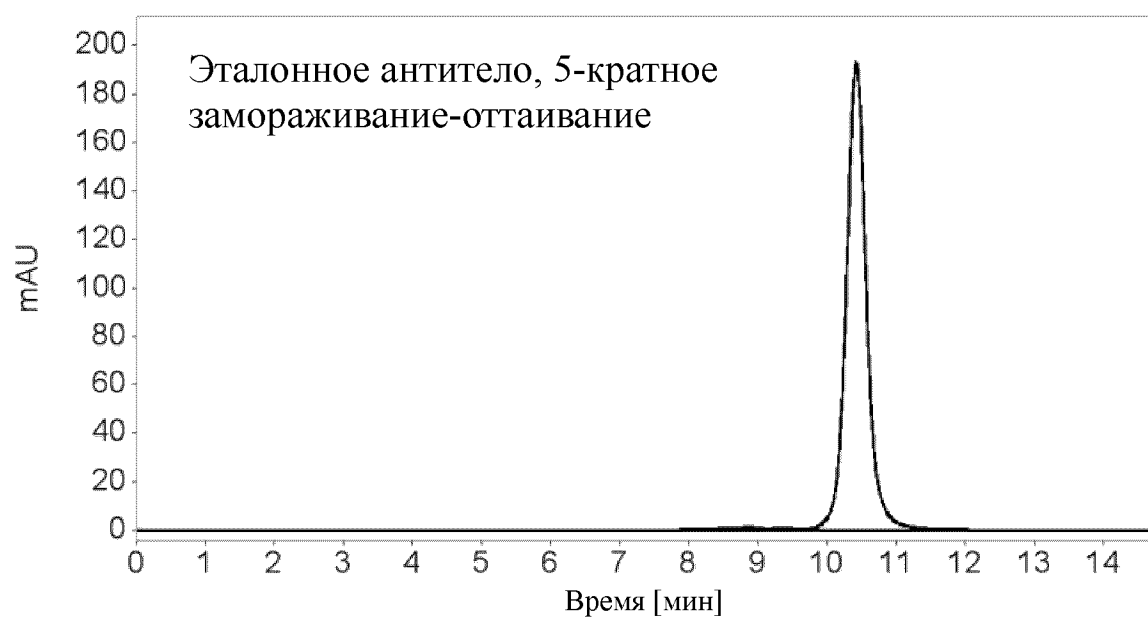


Фиг. 14G

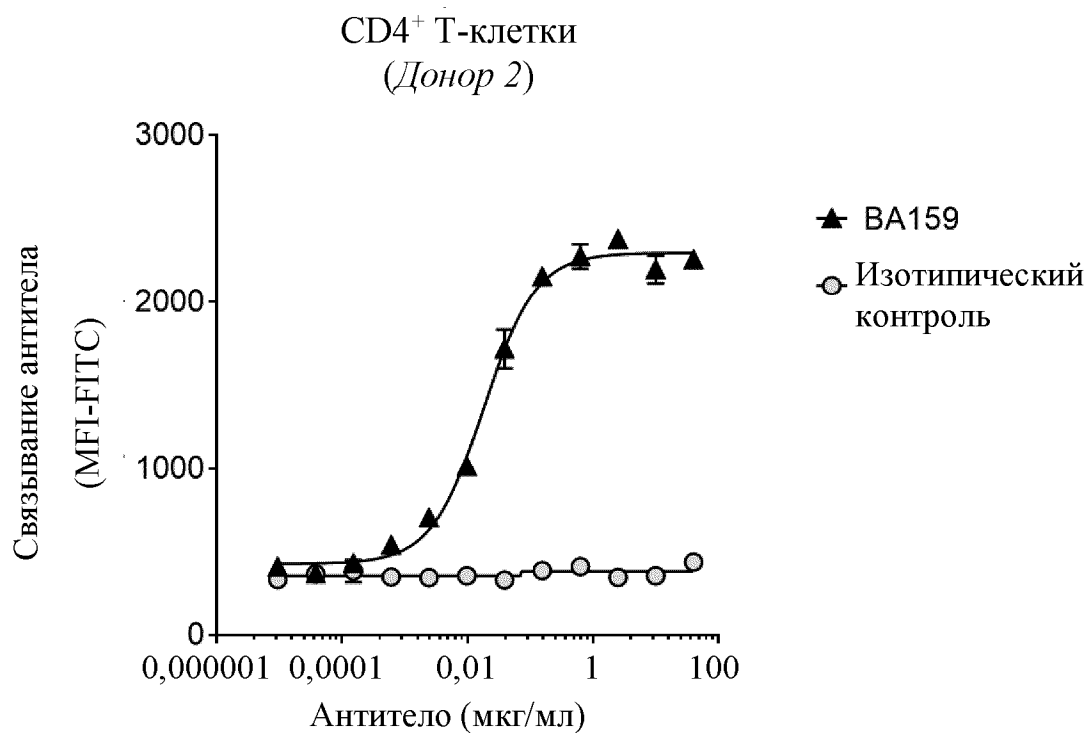


Фиг. 14H

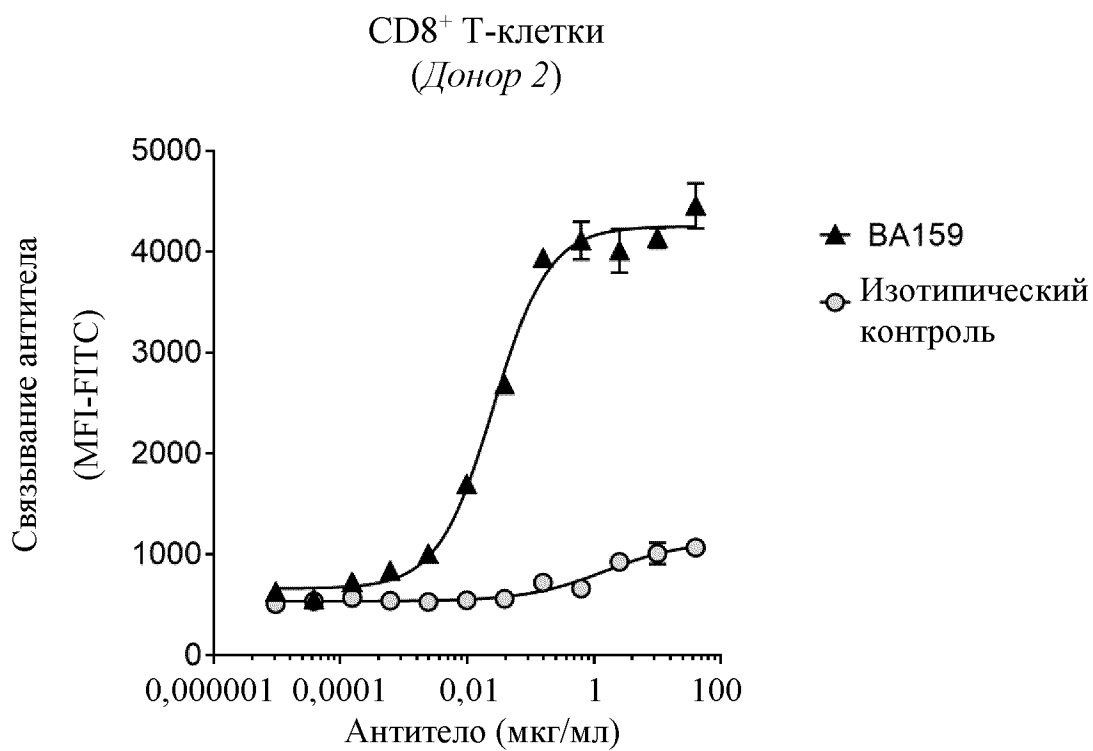
27/33



Фиг. 14I

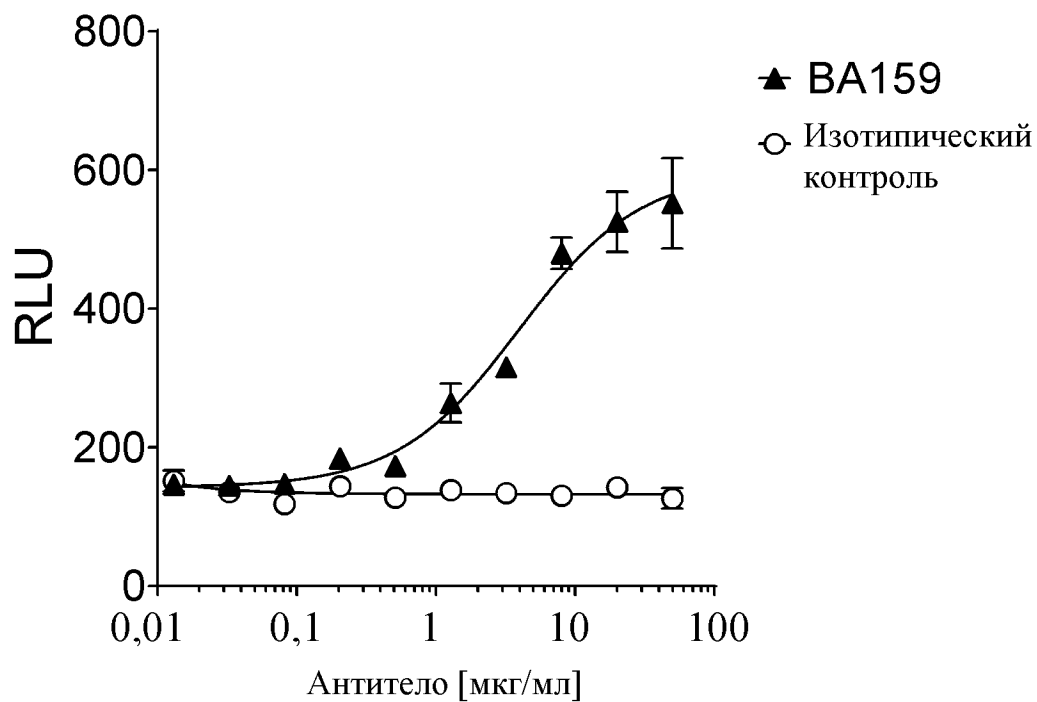


Фиг. 15А

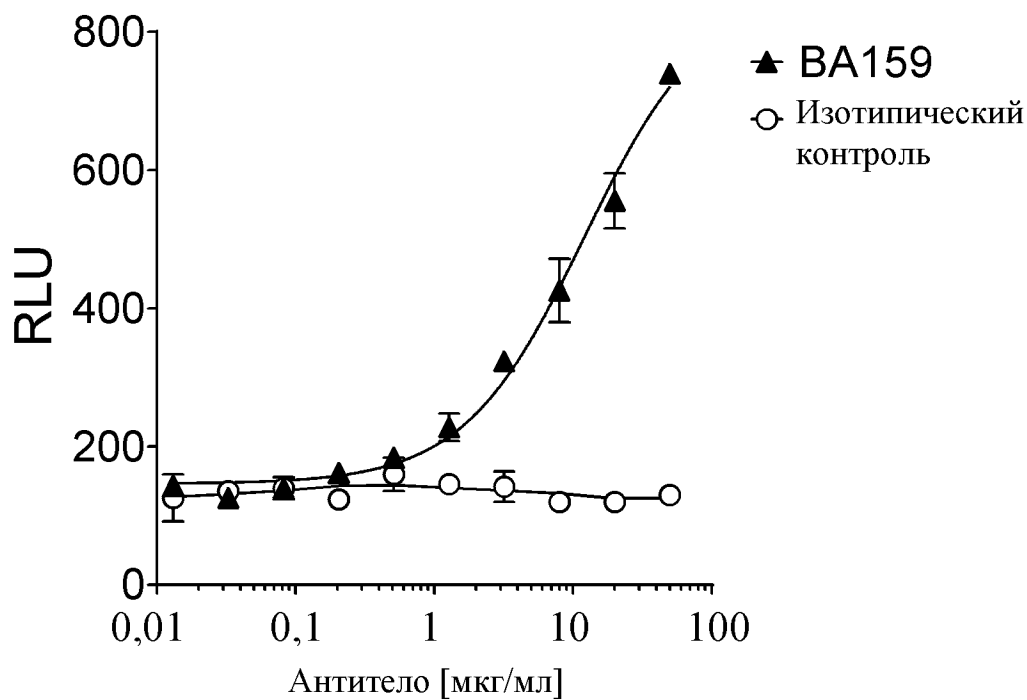


Фиг. 15В

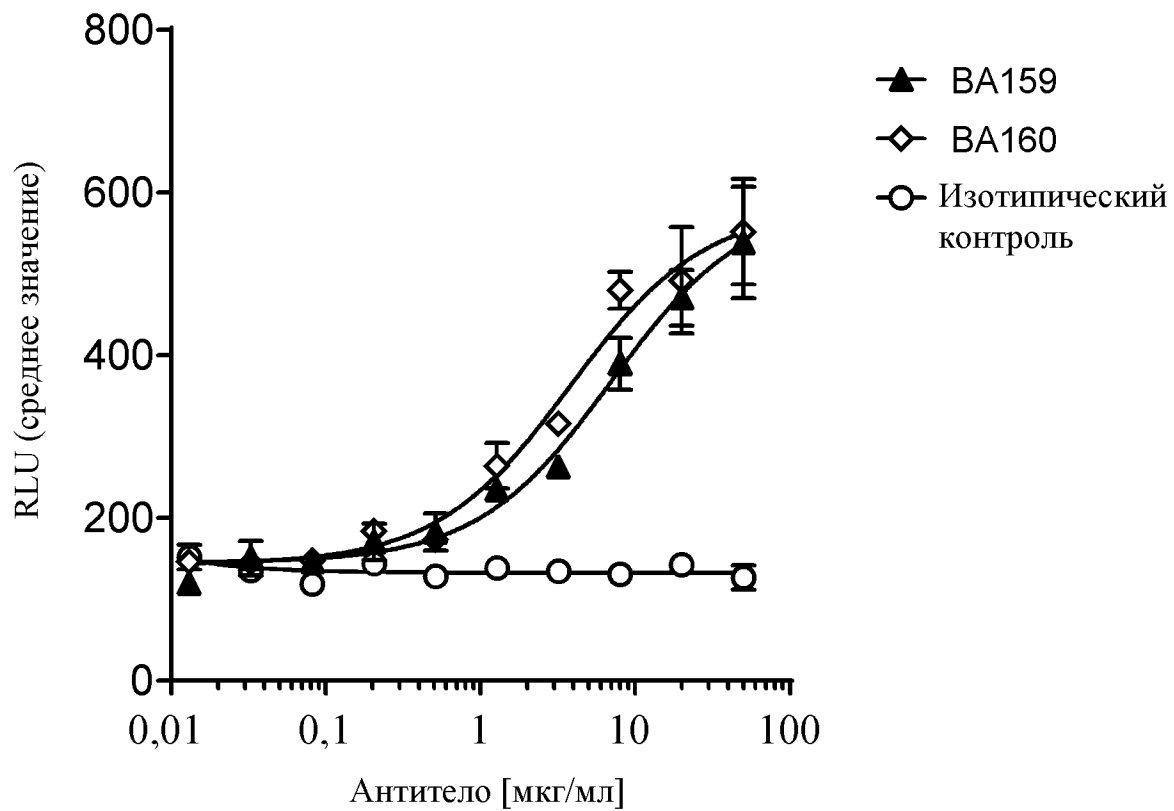
29/33



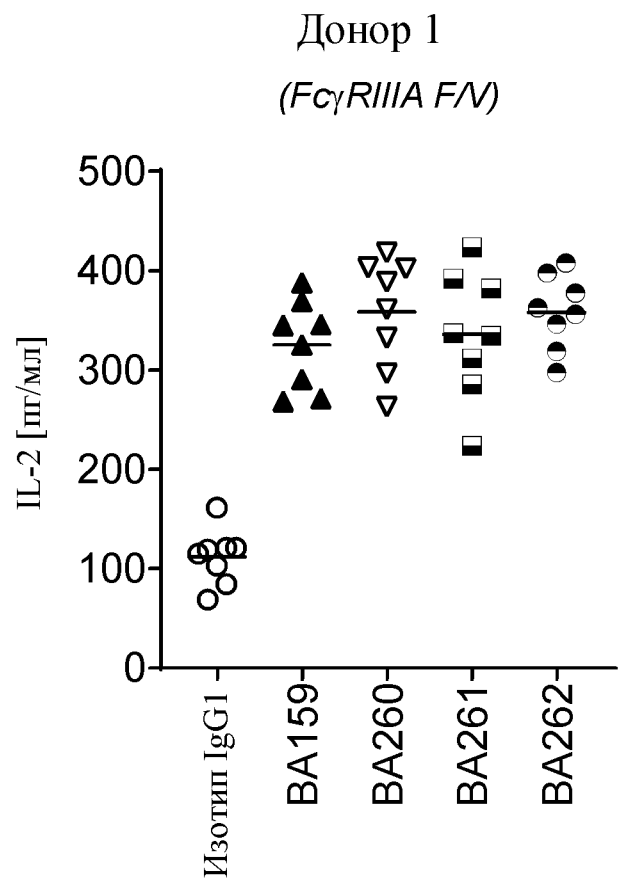
Фиг. 16А



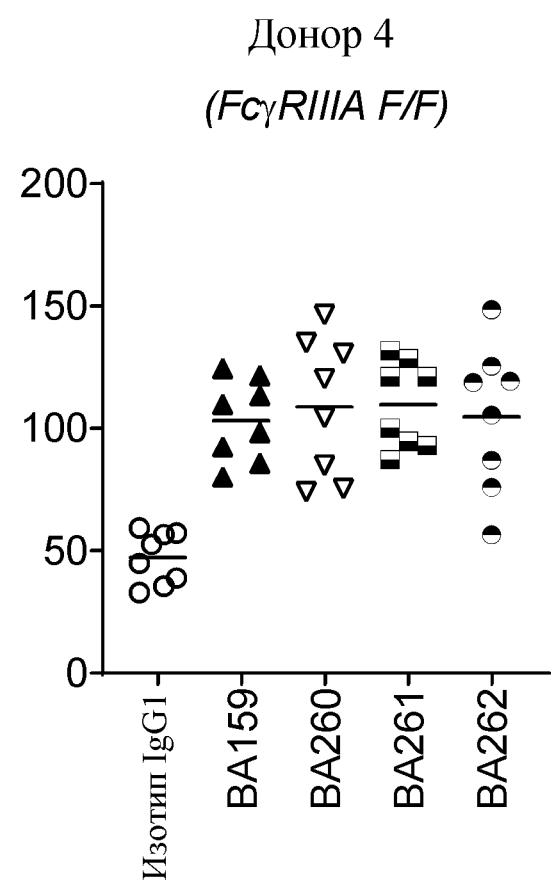
Фиг. 16В



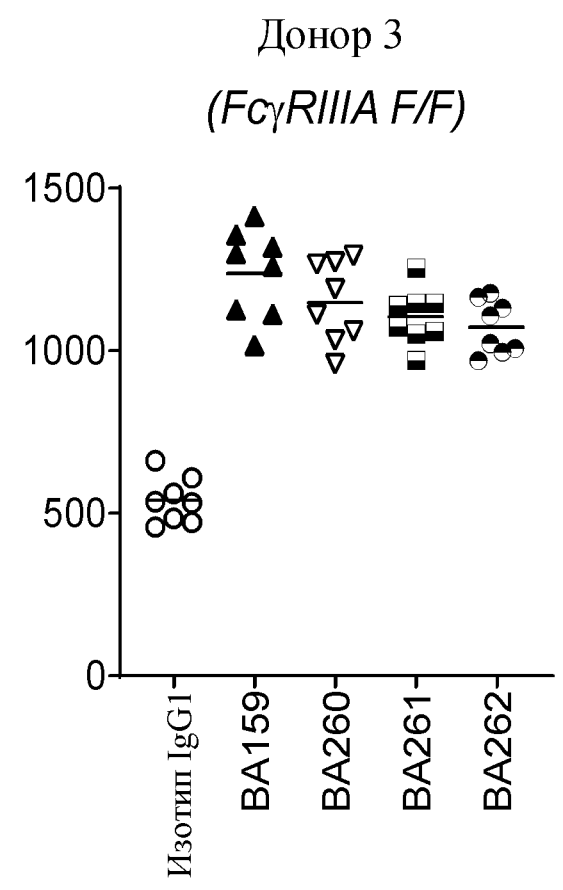
Фиг. 17



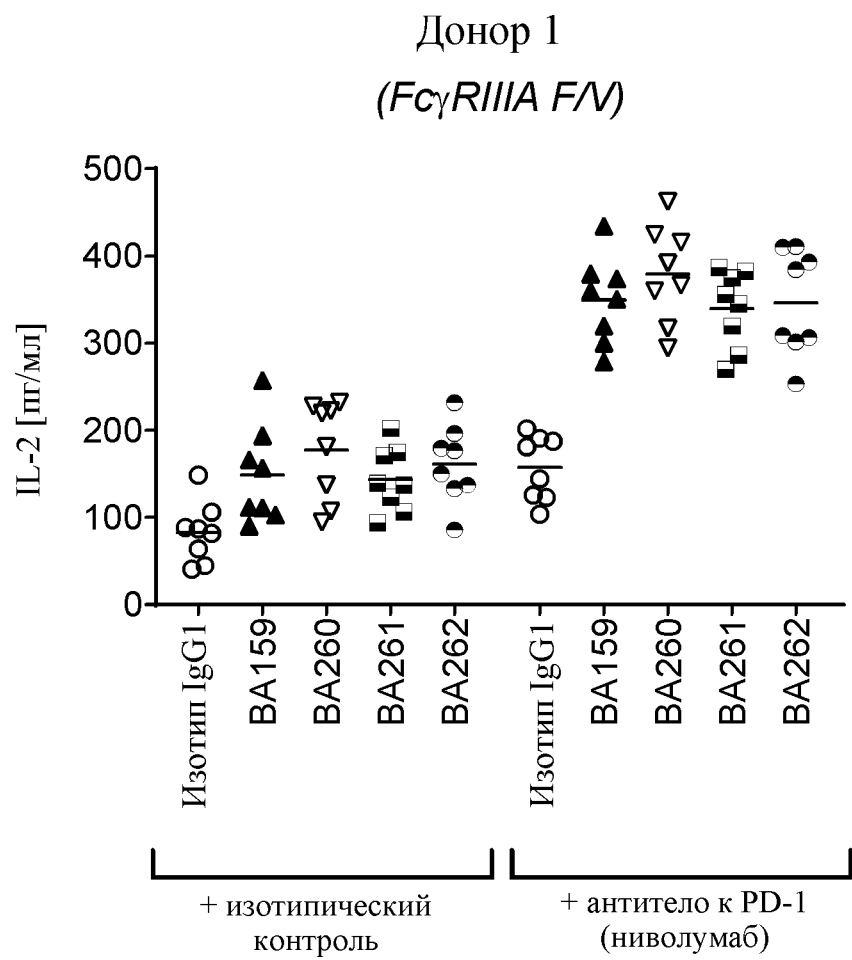
Фиг. 18А



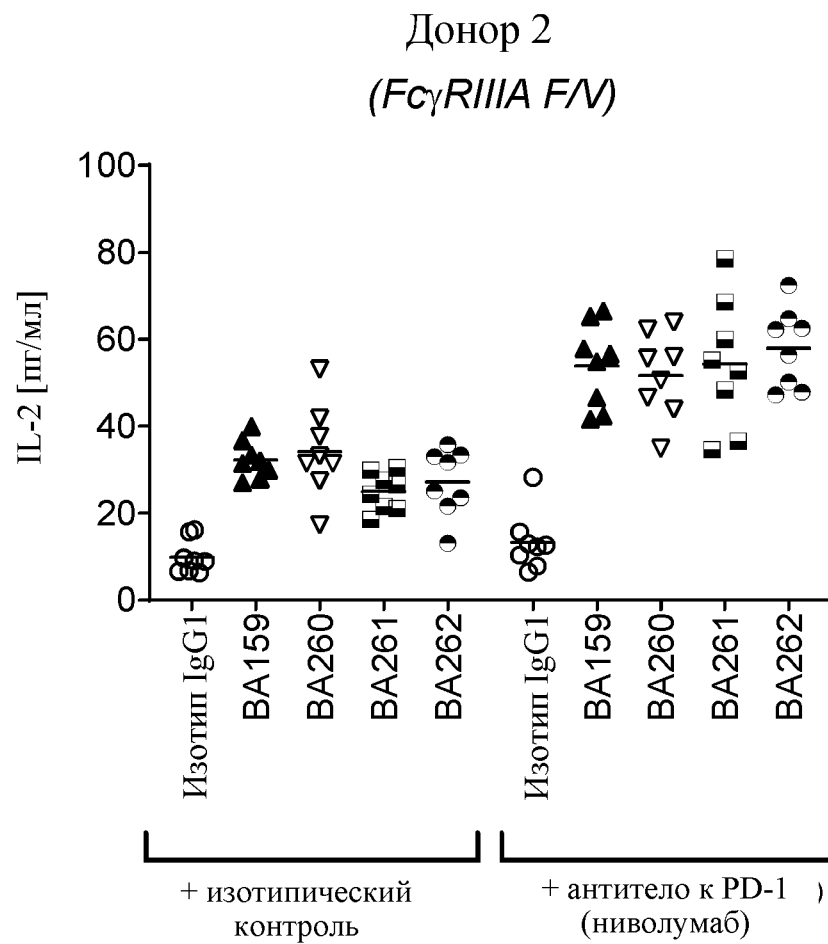
Фиг. 18В



Фиг. 18С

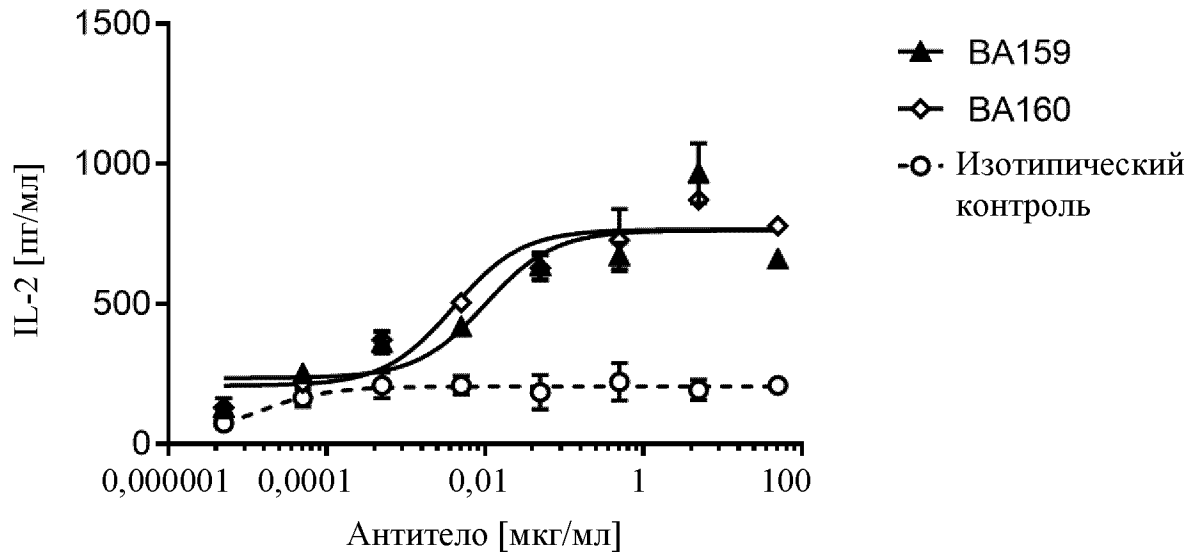


Фиг. 19А



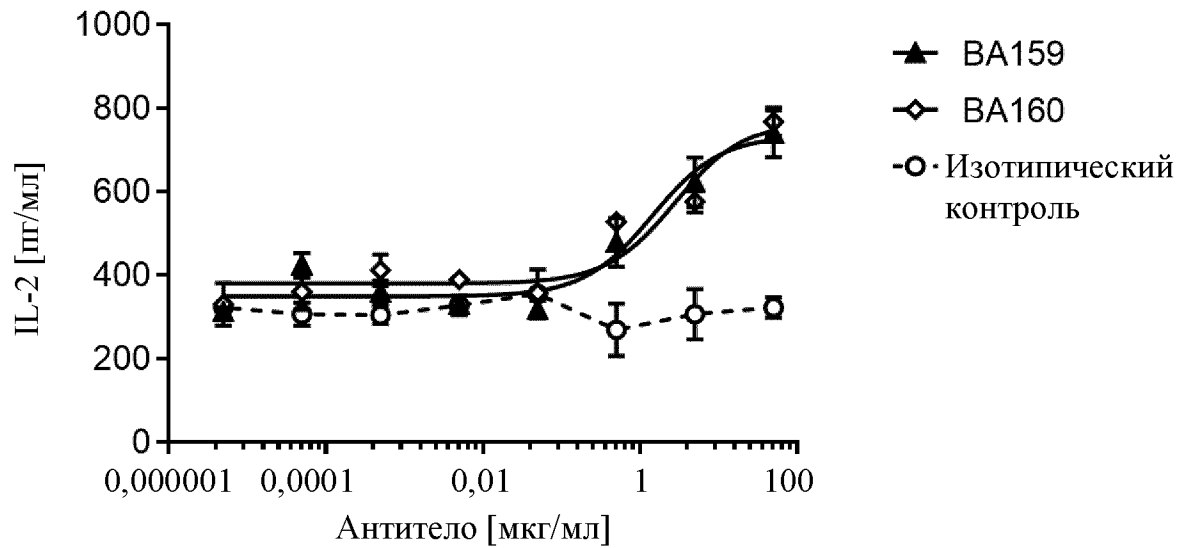
Фиг. 19В

Донор 1
(FcγRIIIA F/V)



Фиг. 20А

Донор 2
(FcγRIIIA F/V)



Фиг. 20В