

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202393082 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.02.13

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.05.04

(54) АНТИТЕЛА К TIGIT, АНТИТЕЛА К CD96 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 63/201,537

(32) 2021.05.04

(33) US

(86) PCT/US2022/072099

(87) WO 2022/236276 2022.11.10

(88) 2023.01.19

(71) Заявитель:
ЭЙДЖЕНУС ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Чанд Дхан Сидхартха, Джавад Захра,
Игнатович Ольга, Рамсей Никола
Энн, Кэмпбелл Спенсер, Уэнсли
Бет, Бриан Эмманюэль Сирилль
Паскаль, Бушелл К. Марк, Морен
Бенжамен Максим, Ильков Вероника
Францишка (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) В настоящем изобретении предусмотрены полиспецифические молекулы, которые специфически связываются с CD96 (например, CD96 человека) и/или TIGIT (например, TIGIT человека), и выделенные антитела, которые специфически связываются с TIGIT (например, TIGIT человека). Также предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие данные полиспецифические молекулы и антитела, нуклеиновые кислоты, кодирующие данные полиспецифические молекулы и антитела, векторы экспрессии и клетки-хозяева для получения данных полиспецифических молекул и антител и способы лечения субъекта с применением данных полиспецифических молекул и антител.

202393082

A1

A1

202393082

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-579422EA/019

АНТИТЕЛА К TIGIT, АНТИТЕЛА К CD96 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

1. РОДСТВЕННАЯ ЗАЯВКА

[0001] Данная заявка испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США № 63/201537, поданной 4 мая 2021 г., которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

2. ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Содержимое предоставленного в электронном виде перечня последовательностей в текстовом файле в формате ASCII (название: 190448_SL; размер 293587 байт; дата создания: 26 апреля 2022 г.) включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

3. ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0003] Настоящее изобретение относится к полиспецифическим молекулам, которые специфически связываются с CD96 (например, CD96 человека) и/или TIGIT (например, TIGIT человека), антителам к TIGIT и способам их применения.

4. УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] CD96 (кластер дифференцировки 96), также известный как TACTILE (белок активации Т-клеток, с повышенной поздней экспрессией), 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 YXXM и экспрессируется на поверхности Т-клеток и естественных киллеров (NK-клеток).

[0005] Считается, что CD96 играет определенную роль в регуляции иммунных клеток (например, NK-клеток и Т-клеток) и метастазировании опухоли. В частности, было показано, что блокада функции CD96 подавляла рост первичной опухоли у нескольких моделей опухолей у мышей зависимым от CD8+ Т-клеток образом.

[0006] Белковый Т-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 (ITT), и экспрессируется на активированных CD4-положительных/CD25-положительных регуляторных Т-клетках (Treg), CD45RO-положительных Т-клетках памяти и естественных киллерах (NK), но не на наивных Т-клетках.

[0007] CD155 (также известный как рецептор полиовируса (PVR)) на высоком уровне экспрессируется на моноцитах и дендритных клетках и способен активировать эффекторные Т-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 Т-клетками и NK-клетками.

[0008] Принимая во внимание роль CD96 человека и TIGIT человека в модуляции иммунных ответов, терапевтические средства, разработанные для блокирования взаимодействий лиганда CD96 и/или взаимодействий лиганда TIGIT, имеют большие перспективы для лечения заболеваний, в которые вовлечено подавление иммунитета.

5. СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0009] В настоящем изобретении предусмотрены полиспецифические молекулы, которые специфически связываются с CD96 (например, CD96 человека) и/или TIGIT (например, TIGIT человека), и антитела, которые специфически связываются с TIGIT (например, TIGIT человека). Также предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие данные полиспецифические молекулы и антитела, нуклеиновые кислоты, кодирующие данные полиспецифические молекулы и антитела, векторы экспрессии и клетки-хозяева для получения данных полиспецифических молекул и антител и способы лечения субъекта с применением данных полиспецифических молекул и антител.

[0010] В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая:

(а) первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 человека, при этом первая антигенсвязывающая область содержит первую VH, содержащую CDR CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и первую VL, содержащую CDR CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где

(i) первая VH содержит аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из аминокислотной последовательности VH под SEQ ID NO: 34, и первая VL содержит аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из аминокислотной последовательности VL под SEQ ID NO: 35,

(ii) первая VH содержит аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из аминокислотной последовательности VH под SEQ ID NO: 36, и первая VL содержит аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из аминокислотной последовательности VL под SEQ ID NO: 37, или

(iii) первая VH содержит аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из аминокислотной последовательности VH под SEQ ID NO: 38, и первая VL содержит аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из аминокислотной последовательности VL под SEQ ID NO: 39, и

(б) вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96 человека, при этом вторая антигенсвязывающая область содержит вторую VH, содержащую CDR CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и вторую VL, содержащую CDR CDRL1, CDRL2 и CDRL3.

[0011] В определенных вариантах осуществления CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 первой антигенсвязывающей области содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13, 14 и 15; 16, 17, 18, 19,

20 и 21; или 22, 23, 24, 25, 26 и 27 соответственно.

[0012] В определенных вариантах осуществления вторая антигенсвязывающая область специфически связывается с TIGIT человека. В конкретном варианте осуществления вторая VH содержит аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из аминокислотной последовательности VH под SEQ ID NO: 40, и вторая VL содержит аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из аминокислотной последовательности VL под SEQ ID NO: 41. В другом варианте осуществления CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 второй антигенсвязывающей области содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 28, 29, 30, 31, 32 и 33 соответственно.

[0013] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая:

(a) первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT человека, при этом первая антигенсвязывающая область содержит первую VH, содержащую CDR CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и первую VL, содержащую CDR CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и

(b) вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT человека, при этом вторая антигенсвязывающая область содержит вторую VH, содержащую аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из аминокислотной последовательности VH под SEQ ID NO: 40, и вторую VL, содержащую аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из аминокислотной последовательности VL под SEQ ID NO: 41.

[0014] В определенных вариантах осуществления CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 второй антигенсвязывающей области содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 28, 29, 30, 31, 32 и 33 соответственно.

[0015] В определенных вариантах осуществления первая антигенсвязывающая область специфически связывается с CD96 человека. В конкретном варианте осуществления первая VH содержит аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 34, 36 или 38. В другом варианте осуществления аминокислотная последовательность первой VH состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 34, 36 или 38. В другом варианте осуществления первая VL содержит аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 35, 37 или 39. В другом варианте осуществления аминокислотная последовательность первой VL состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 35, 37 или 39.

[0016] В определенных вариантах осуществления вторая VH содержит аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности под SEQ

ID NO: 40. В конкретном варианте осуществления аминокислотная последовательность второй VH состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 40.

[0017] В определенных вариантах осуществления вторая VL содержит аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 41. В конкретном варианте осуществления аминокислотная последовательность второй VL состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 41.

[0018] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая:

(a) первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 человека, при этом антигенсвязывающая область содержит первую VH и первую VL, где первая VH содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34, 36 или 38, и/или первая VL содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 35, 37 или 39, и

(b) вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96 человека, при этом вторая антигенсвязывающая область содержит вторую VH и вторую VL.

[0019] В определенных вариантах осуществления вторая антигенсвязывающая область специфически связывается с TIGIT человека.

[0020] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая:

(a) первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT человека, при этом первая антигенсвязывающая область содержит первую VH и первую VL, и

(b) вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT человека, при этом антигенсвязывающая область содержит вторую VH и вторую VL, где вторая VH содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 40, и/или вторая VL содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 41.

[0021] В определенных вариантах осуществления первая антигенсвязывающая область специфически связывается с CD96 человека. В конкретном варианте осуществления первая VH содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34, 36 или 38, и первая VL содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 35, 37 или 39. В другом варианте осуществления аминокислотная последовательность первой VH состоит из SEQ ID NO: 34, 36 или 38, и аминокислотная последовательность первой VL состоит из SEQ ID NO: 35, 37 или 39. В другом варианте осуществления первая VH и первая VL содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 34 и 35; 36 и 37 или 38 и 39 соответственно. В другом варианте осуществления аминокислотные последовательности первой VH и первой VL состоят из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 34 и 35; 36 и 37 или 38 и 39 соответственно. В другом варианте осуществления вторая VH содержит аминокислотную

последовательность под SEQ ID NO: 40, и вторая VL содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 41. В другом варианте осуществления аминокислотные последовательности второй VH и второй VL состоят из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 40 и 41 соответственно. В другом варианте осуществления первая VH и первая VL содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 34 и 35; 36 и 37 или 38 и 39 соответственно, и вторая VH и вторая VL содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 40 и 41 соответственно. В другом варианте осуществления аминокислотные последовательности первой VH и первой VL состоят из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 34 и 35; 36 и 37 или 38 и 39 соответственно, и аминокислотные последовательности второй VH и второй VL состоят из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 40 и 41 соответственно.

[0022] В определенных вариантах осуществления первая и/или вторая антигенсвязывающие области содержат константную область тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂ человека. В конкретном варианте осуществления константная область тяжелой цепи представляет собой константную область тяжелой цепи IgG₁. В другом варианте осуществления константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 49-60.

[0023] В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG₁ содержит мутацию N297A, пронумерованную в соответствии с системой нумерации EU.

[0024] В определенных вариантах осуществления первая и/или вторая антигенсвязывающие области содержат 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 конкретном варианте осуществления FcγR представляет собой FcγRIIB или FcγRIIA.

[0025] В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG₁ содержит мутации S267E и L328F, пронумерованные в соответствии с системой нумерации EU.

[0026] В определенных вариантах 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.

[0027] В определенных вариантах осуществления первая антигенсвязывающая область содержит первую константную область тяжелой цепи, содержащую аспарат в аминокислотном положении 239; аспарат и глутамат в аминокислотных положениях 239 и 332 соответственно или аспарат, лейцин и глутамат в аминокислотных положениях 239, 330 и 332 соответственно, и

вторая антигенсвязывающая область содержит вторую константную область тяжелой цепи, которая не содержит аспарат, лейцин и глутамат в аминокислотных положениях 239, 330 и 332 соответственно,

где аминокислотные положения пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU.

[0028] В конкретном варианте осуществления первая константная область тяжелой цепи и вторая константная область тяжелой цепи содержат SEQ ID NO: 58 и 57; 59 и 57 или 60 и 57 соответственно.

[0029] В определенных вариантах осуществления первая антигенсвязывающая область содержит первую константную область тяжелой цепи, содержащую аспарат и глутамат в аминокислотных положениях 239 и 332 соответственно или аспарат, лейцин и глутамат в аминокислотных положениях 239, 330 и 332 соответственно, и

вторая антигенсвязывающая область содержит вторую константную область тяжелой цепи, содержащую аспарат в аминокислотных положениях 239,

где аминокислотные положения пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU.

[0030] В конкретном варианте осуществления первая константная область тяжелой цепи и вторая тяжелая цепь и константная область содержат SEQ ID NO: 59 и 58 или 60 и 58 соответственно.

[0031] В определенных вариантах осуществления первая константная область тяжелой цепи содержит аспарат, лейцин и глутамат в аминокислотных положениях 239, 330 и 332 соответственно, и

вторая константная область тяжелой цепи дополнительно содержит глутамат в аминокислотном положении 332,

где аминокислотные положения пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU.

[0032] В конкретном варианте осуществления первая константная область тяжелой цепи и вторая константная область тяжелой цепи содержат SEQ ID NO: 60 и 59 соответственно.

[0033] В определенных вариантах осуществления первая антигенсвязывающая область содержит первую константную область тяжелой цепи, которая не содержит аспарат, лейцин и глутамат в аминокислотных положениях 239, 330 и 332 соответственно, и

вторая антигенсвязывающая область содержит вторую константную область тяжелой цепи, содержащую аспарат в аминокислотном положении 239; аспарат и глутамат в аминокислотных положениях 239 и 332 соответственно или аспарат, лейцин и глутамат в аминокислотных положениях 239, 330 и 332 соответственно,

где аминокислотные положения пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU.

[0034] В конкретном варианте осуществления первая константная область тяжелой

цепи и вторая константная область тяжелой цепи содержат SEQ ID NO: 57 и 60; 57 и 59 или 57 и 58 соответственно.

[0035] В определенных вариантах осуществления первая антигенсвязывающая область содержит первую константную область тяжелой цепи, содержащую аспарат в аминокислотных положениях 239, и

вторая антигенсвязывающая область содержит вторую константную область тяжелой цепи, содержащую аспарат и глутамат в аминокислотных положениях 239 и 332 соответственно или аспарат, лейцин и глутамат в аминокислотных положениях 239, 330 и 332 соответственно,

где аминокислотные положения пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU.

[0036] В конкретном варианте осуществления первая константная область тяжелой цепи и вторая константная область тяжелой цепи содержат SEQ ID NO: 58 и 60 или 58 и 59 соответственно.

[0037] В определенных вариантах осуществления первая константная область тяжелой цепи дополнительно содержит глутамат в аминокислотном положении 332, и

вторая константная область тяжелой цепи содержит аспарат, лейцин и глутамат в аминокислотных положениях 239, 330 и 332 соответственно,

где аминокислотные положения пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU.

[0038] В конкретном варианте осуществления первая константная область тяжелой цепи и вторая константная область тяжелой цепи содержат SEQ ID NO: 59 и 60 соответственно.

[0039] В определенных вариантах осуществления первая антигенсвязывающая область содержит первую константную область тяжелой цепи, содержащую триптофан в аминокислотном положении 366, и

вторая антигенсвязывающая область содержит вторую константную область тяжелой цепи, содержащую серин, аланин и валин в аминокислотных положениях 366, 368 и 407 соответственно,

где аминокислотные положения пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU.

[0040] В конкретном варианте осуществления первая константная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 53, 54, 55 или 56, и вторая константная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 49, 50, 51 или 52.

[0041] В определенных вариантах осуществления первая антигенсвязывающая область содержит первую константную область тяжелой цепи, содержащую серин, аланин и валин в аминокислотных положениях 366, 368 и 407 соответственно, и

вторая антигенсвязывающая область содержит вторую константную область тяжелой цепи, содержащую триптофан в аминокислотном положении 366,

где аминокислотные положения пронумерованы в соответствии с системой

нумерации EU.

[0042] В конкретном варианте осуществления первая константная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 49, 50, 51 или 52, и вторая константная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 53, 54, 55 или 56.

[0043] В определенных вариантах осуществления первая антигенсвязывающая область содержит первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, 3, 5 или 67-99. В конкретном варианте осуществления первая тяжелая цепь состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1, 3, 5 или 67-99. В определенных вариантах осуществления вторая антигенсвязывающая область содержит вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7 или 100-110. В конкретном варианте осуществления аминокислотная последовательность второй тяжелой цепи состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7 или 100-110.

[0044] В определенных вариантах осуществления полиспецифическая молекула содержит константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 42, 43 или 44. В конкретном варианте осуществления первая антигенсвязывающая область содержит первую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2, 4 или 6. В другом варианте осуществления первая легкая цепь состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2, 4 или 6. В конкретном варианте осуществления вторая антигенсвязывающая область содержит вторую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8 или 9. В другом варианте осуществления аминокислотная последовательность второй легкой цепи состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 8 или 9.

[0045] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая:

(a) первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 человека, при этом первая антигенсвязывающая область содержит первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, 3, 5 или 67-99, и/или первую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2, 4 или 6, и

(b) вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96 человека, при этом вторая антигенсвязывающая область содержит вторую тяжелую цепь и вторую легкую цепь.

[0046] В определенных вариантах осуществления вторая антигенсвязывающая область специфически связывается с TIGIT человека.

[0047] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая:

(a) первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT человека, при этом первая антигенсвязывающая область

содержит первую тяжелую цепь и первую легкую цепь, и

(b) вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT человека, при этом вторая антигенсвязывающая область содержит вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7 или 100-110, и/или вторую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8 или 9.

[0048] В определенных вариантах осуществления первая антигенсвязывающая область специфически связывается с CD96 человека. В конкретном варианте осуществления первая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, 3, 5 или 67-99, и/или первая легкая цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2, 4 или 6. В другом варианте осуществления первая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, 3, 5 или 67-99, и первая легкая цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2, 4 или 6. В другом варианте осуществления аминокислотная последовательность первой тяжелой цепи состоит из SEQ ID NO: 1, 3, 5 или 67-99, и аминокислотная последовательность первой легкой цепи состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2, 4 или 6.

[0049] В определенных вариантах осуществления вторая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7 или 100-110, и/или вторая легкая цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8 или 9. В конкретном варианте осуществления вторая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7 или 100-110, и вторая легкая цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8 или 9. В другом варианте осуществления аминокислотная последовательность второй тяжелой цепи состоит из SEQ ID NO: 7, и аминокислотная последовательность второй легкой цепи состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 8 или 9.

[0050] В определенных вариантах осуществления первая тяжелая цепь и первая легкая цепь содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 1 и 2; 3 и 4 или 5 и 6 соответственно, и/или вторая тяжелая цепь и вторая легкая цепь содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 7 и 8 или 7 и 9 соответственно. В конкретном варианте осуществления первая тяжелая цепь и первая легкая цепь содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 1 и 2; 3 и 4 или 5 и 6 соответственно, и вторая тяжелая цепь и вторая легкая цепь содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 7 и 8 или 7 и 9 соответственно. В другом варианте осуществления аминокислотные последовательности первой тяжелой цепи и первой легкой цепи состоят из SEQ ID NO: 1 и 2; 3 и 4 или 5 и 6 соответственно, и аминокислотные последовательности второй тяжелой цепи и второй легкой цепи состоят из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 7 и 8 или 7 и 9 соответственно.

[0051] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область,

которая специфически связывается с CD96 человека, и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT человека, где:

(a) первая антигенсвязывающая область содержит аспартат, лейцин, глутамат и триптофан в аминокислотных положениях 239, 330, 332 и 366 соответственно, и

(b) вторая антигенсвязывающая область содержит серин, аланин и валин в аминокислотных положениях 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аспартат, лейцин и глутамат в аминокислотных положениях 239, 330 и 332 соответственно,

где аминокислотные положения пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU.

[0052] В некоторых вариантах осуществления первая антигенсвязывающая область содержит SEQ ID NO: 73, 84, 95 или 56, и вторая антигенсвязывающая область содержит SEQ ID NO: 103 или 49.

[0053] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 человека, и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT человека, где:

(a) первая антигенсвязывающая область содержит аспартат, лейцин, глутамат и триптофан в аминокислотных положениях 239, 330, 332 и 366 соответственно, и

(b) вторая антигенсвязывающая область содержит аспартат, серин, аланин и валин в аминокислотных положениях 239, 366, 368 и 407 соответственно,

где аминокислотные положения пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU.

[0054] В определенных вариантах осуществления первая антигенсвязывающая область содержит SEQ ID NO: 73, 84, 95 или 56, и вторая антигенсвязывающая область содержит SEQ ID NO: 104 или 50.

[0055] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 человека, и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT человека, где:

(a) первая антигенсвязывающая область содержит серин, аланин и валин в аминокислотных положениях 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аспартат, лейцин и глутамат в аминокислотных положениях 239, 330 и 332 соответственно, и

(b) вторая антигенсвязывающая область содержит аспартат, лейцин, глутамат и триптофан в аминокислотных положениях 239, 330, 332 и 366 соответственно,

где аминокислотные положения пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU.

[0056] В определенных вариантах осуществления первая антигенсвязывающая область содержит SEQ ID NO: 67, 78, 89 или 49, и вторая антигенсвязывающая область содержит SEQ ID NO: 7 или 56.

[0057] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрена

полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 человека, и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT человека, где:

(а) первая антигенсвязывающая область аспартат, серин, аланин и валин в аминокислотных положениях 239, 366, 368 и 407 соответственно, и

(b) вторая антигенсвязывающая область содержит аспартат, лейцин, глутамат и триптофан в аминокислотных положениях 239, 330, 332 и 366 соответственно,

где аминокислотные положения пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU.

[0058] В определенных вариантах осуществления первая антигенсвязывающая область содержит SEQ ID NO: 1, 3, 5 или 50, и вторая антигенсвязывающая область содержит SEQ ID NO: 7 или 56.

[0059] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 человека, и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT человека, где:

(а) первая антигенсвязывающая область содержит аспартат, глутамат и триптофан в аминокислотных положениях 239, 332 и 366 соответственно, и

(b) вторая антигенсвязывающая область содержит серин, аланин и валин в аминокислотных положениях 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аспартат, лейцин и глутамат в аминокислотных положениях 239, 330 и 332 соответственно,

где аминокислотные положения пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU.

[0060] В определенных вариантах осуществления первая антигенсвязывающая область содержит SEQ ID NO: 72, 83, 94 или 55, и вторая антигенсвязывающая область содержит SEQ ID NO: 103 или 49.

[0061] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 человека, и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT человека, где:

(а) первая антигенсвязывающая область содержит серин, аланин и валин в аминокислотных положениях 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аспартат, лейцин и глутамат в аминокислотных положениях 239, 330 и 332 соответственно, и

(b) вторая антигенсвязывающая область содержит аспартат, глутамат и триптофан в аминокислотных положениях 239, 332 и 366 соответственно,

где аминокислотные положения пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU.

[0062] В определенных вариантах осуществления первая антигенсвязывающая область содержит SEQ ID NO: 67, 78, 89 или 49, и вторая антигенсвязывающая область содержит SEQ ID NO: 102 или 55.

[0063] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIGIT человека, при этом антитело содержит: VH, содержащую аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из аминокислотной последовательности VH под SEQ ID NO: 40, и VL, содержащую аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из аминокислотной последовательности VL под SEQ ID NO: 41. В определенных вариантах осуществления антитело содержит аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 под SEQ ID NO: 28, 29, 30, 31, 32 и 33 соответственно. В конкретном варианте осуществления антитело содержит аминокислотную последовательность VH под SEQ ID NO: 40. В другом варианте осуществления VH состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 40. В другом варианте осуществления антитело содержит аминокислотную последовательность VL под SEQ ID NO: 41. В другом варианте осуществления аминокислотная последовательность VL состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 41.

[0064] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIGIT человека, при этом антитело содержит VH и VL, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 40 и 41 соответственно. В определенных вариантах осуществления VH и VL состоят из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 40 и 41 соответственно.

[0065] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит константную область тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂ человека. В конкретном 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: 57, 58, 59 или 60.

[0066] В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG₁ содержит мутацию N297A, пронумерованную в соответствии с системой нумерации EU.

[0067] 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 конкретном варианте осуществления FcγR представляет собой FcγRIIB или FcγRIIA.

[0068] В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG₁ содержит мутации S267E и L328F, пронумерованные в соответствии с системой нумерации EU.

[0069] В определенных вариантах осуществления константная область 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.

[0070] В определенных вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7. В конкретном варианте осуществления аминокислотная последовательность тяжелой цепи состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7.

[0071] В определенных вариантах осуществления антитело содержит константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 43 или 44. В конкретном варианте осуществления антитело содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8 или 9. В другом варианте осуществления аминокислотная последовательность легкой цепи состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 8 или 9.

[0072] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIGIT человека, при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 107, 108, 109 или 110, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8 или 9. В конкретном варианте осуществления аминокислотная последовательность тяжелой цепи состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 107, 108, 109 или 110, и аминокислотная последовательность легкой цепи состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 8 или 9. В другом варианте осуществления тяжелая цепь и легкая цепь содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 107 и 8; 107 и 9; 108 и 8; 108 и 9; 109 и 8; 109 и 9; 110 и 8 или 110 и 9 соответственно. В другом варианте осуществления аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи состоят из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 107 и 8; 107 и 9; 108 и 8; 108 и 9; 109 и 8; 109 и 9; 110 и 8 или 110 и 9 соответственно.

[0073] В определенных вариантах осуществления антитело является полиспецифическим.

[0074] В определенных вариантах осуществления полиспецифическая молекула или выделенное антитело конъюгированы с цитотоксическим средством, цитостатическим средством, токсином, радионуклидом или выявляемой меткой. В определенных вариантах осуществления полиспецифическая молекула или выделенное антитело конъюгированы с антителом.

[0075] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен выделенный полинуклеотид, кодирующий:

(a) VH, VL, тяжелую цепь и/или легкую цепь полиспецифической молекулы, раскрытой в данном документе;

(b) первую VH и первую VL полиспецифической молекулы, раскрытой в данном документе;

(c) вторую VH и вторую VL полиспецифической молекулы, раскрытой в данном документе;

(d) первую тяжелую цепь и первую легкую цепь полиспецифической молекулы, раскрытой в данном документе, или

(e) вторую тяжелую цепь и вторую легкую цепь полиспецифической молекулы, раскрытой в данном документе.

[0076] 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.

[0077] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен вектор, содержащий полинуклеотид, раскрытый в данном документе.

[0078] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрена рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая:

(a) полинуклеотид, раскрытый в данном документе;

(b) вектор, раскрытый в данном документе;

(c) первый полинуклеотид, кодирующий VH и VL первой антигенсвязывающей области, раскрытой в данном документе, и второй полинуклеотид, кодирующий VH и VL второй антигенсвязывающей области, раскрытой в данном документе;

(d) первый вектор, содержащий первый полинуклеотид, кодирующий VH и VL первой антигенсвязывающей области, раскрытой в данном документе, и второй вектор, содержащий второй полинуклеотид, кодирующий VH и VL второй антигенсвязывающей области, раскрытой в данном документе;

(e) первый полинуклеотид, кодирующий VH первой антигенсвязывающей области, раскрытой в данном документе, второй полинуклеотид, кодирующий VL первой антигенсвязывающей области, раскрытой в данном документе, третий полинуклеотид, кодирующий VH второй антигенсвязывающей области, раскрытой в данном документе, и четвертый полинуклеотид, кодирующий VL второй антигенсвязывающей области, раскрытой в данном документе;

(f) первый вектор, содержащий первый полинуклеотид, кодирующий VH первой антигенсвязывающей области, раскрытой в данном документе, второй вектор, содержащий второй полинуклеотид, кодирующий VL первой антигенсвязывающей области, раскрытой в данном документе, третий вектор, содержащий третий полинуклеотид, кодирующий VH второй антигенсвязывающей области, раскрытой в данном документе, и четвертый вектор, содержащий четвертый полинуклеотид, кодирующий VL второй антигенсвязывающей области, раскрытой в данном документе;

(g) первый полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь и легкую цепь первой антигенсвязывающей области, раскрытой в данном документе, и второй полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь и легкую цепь второй антигенсвязывающей области, раскрытой в данном документе;

(h) первый вектор, содержащий первый полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь и легкую цепь первой антигенсвязывающей области, раскрытой в данном документе, и второй вектор, содержащий второй полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь и

легкую цепь второй антигенсвязывающей области, раскрытой в данном документе;

(i) первый полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь первой антигенсвязывающей области, раскрытой в данном документе, второй полинуклеотид, кодирующий легкую цепь первой антигенсвязывающей области, раскрытой в данном документе, третий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь второй антигенсвязывающей области, раскрытой в данном документе, и четвертый полинуклеотид, кодирующий VL второй антигенсвязывающей области, раскрытой в данном документе, или

(j) первый вектор, содержащий первый полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь первой антигенсвязывающей области, раскрытой в данном документе, второй вектор, содержащий второй полинуклеотид, кодирующий легкую цепь первой антигенсвязывающей области, раскрытой в данном документе, третий вектор, содержащий третий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь второй антигенсвязывающей области, раскрытой в данном документе, и четвертый вектор, содержащий четвертый полинуклеотид, кодирующий легкую цепь второй антигенсвязывающей области, раскрытой в данном документе.

[0079] 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 выделенного антитела, раскрытого в данном документе;

(d) первый вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий VH и VL выделенного антитела, раскрытого в данном документе;

(e) первый полинуклеотид, кодирующий VH выделенного антитела, раскрытого в данном документе, и второй полинуклеотид, кодирующий VL выделенного антитела, раскрытого в данном документе, или

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

[0080] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая полиспецифическую молекулу, раскрытую в данном документе, 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.

[0081] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ получения полиспецифической молекулы или выделенного антитела, при этом способ включает культивирование клетки-хозяина, раскрытой в данном документе, в подходящих

условиях, так что экспрессируется полинуклеотид и продуцируется полиспецифическая молекула или выделенное антитело.

[0082] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ получения полиспецифической молекулы, при этом способ включает экспрессию в клетке:

(a) первого полинуклеотида, кодирующего VH и VL первой антигенсвязывающей области, раскрытой в данном документе, и второго полинуклеотида, кодирующего VH и VL второй антигенсвязывающей области, раскрытой в данном документе, или

(b) первого полинуклеотида, кодирующего тяжелую цепь и легкую цепь первой антигенсвязывающей области, раскрытой в данном документе, и второго полинуклеотида, кодирующего тяжелую цепь и легкую цепь второй антигенсвязывающей области, раскрытой в данном документе,

в подходящих условиях, так что экспрессируются полинуклеотиды и продуцируется полиспецифическая молекула.

[0083] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ получения полиспецифической молекулы, при этом способ включает экспрессию в клетке:

(a) первого полинуклеотида, кодирующего VH первой антигенсвязывающей области, раскрытой в данном документе, второго полинуклеотида, кодирующего VL первой антигенсвязывающей области, раскрытой в данном документе, третьего полинуклеотида, кодирующего VH второй антигенсвязывающей, раскрытой в данном документе, и четвертого полинуклеотида, кодирующего VL второй антигенсвязывающей области, раскрытой в данном документе, или

(b) первого полинуклеотида, кодирующего тяжелую цепь первой антигенсвязывающей области, раскрытой в данном документе, второго полинуклеотида, кодирующего легкую цепь первой антигенсвязывающей области, раскрытой в данном документе, третьего полинуклеотида, кодирующего тяжелую цепь второй антигенсвязывающей области, раскрытой в данном документе, и четвертого полинуклеотида, кодирующего легкую цепь второй антигенсвязывающей области, раскрытой в данном документе,

в подходящих условиях, так что экспрессируются полинуклеотиды и продуцируется полиспецифическая молекула.

[0084] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ получения полиспецифической молекулы, при этом способ включает:

(a) экспрессию в первой клетке первого полинуклеотида, кодирующего VH и VL первой антигенсвязывающей области, раскрытой в данном документе, в условиях, при которых продуцируется первая антигенсвязывающая область;

(b) экспрессию во второй клетке второго полинуклеотида, кодирующего VH и VL второй антигенсвязывающей области, раскрытой в данном документе, в условиях, при которых продуцируется вторая антигенсвязывающая область, и

(c) приведение в контакт первой и второй антигенсвязывающих областей, продуцированных на стадиях (a) и (b), в подходящих условиях, обеспечивающих

продуцирование полиспецифической молекулы.

[0085] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ получения полиспецифической молекулы, при этом способ включает:

(а) экспрессию в первой клетке первого полинуклеотида, кодирующего VH первой антигенсвязывающей области, раскрытой в данном документе, и второго полинуклеотида, кодирующего VL первой антигенсвязывающей области, раскрытой в данном документе, в условиях, при которых продуцируется первая антигенсвязывающая область;

(b) экспрессию во второй клетке третьего полинуклеотида, кодирующего VH второй антигенсвязывающей области, раскрытой в данном документе, и четвертого полинуклеотида, кодирующего VL второй антигенсвязывающей области, раскрытой в данном документе, в условиях, при которых продуцируется вторая антигенсвязывающая область, и

(с) приведение в контакт первой и второй антигенсвязывающих областей, продуцированных на стадиях (а) и (b), в условиях, обеспечивающих продуцирование полиспецифической молекулы.

[0086] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ получения полиспецифической молекулы, при этом способ включает приведение в контакт первой антигенсвязывающей области и второй антигенсвязывающей области, раскрытых в данном документе, в условиях, обеспечивающих продуцирование полиспецифической молекулы.

[0087] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ получения выделенного антитела, при этом способ включает экспрессию в клетке:

(а) полинуклеотида, кодирующего VH и VL антитела, раскрытого в данном документе, или

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

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

[0088] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ получения выделенного антитела, при этом способ включает экспрессию в клетке:

(а) 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 легкой цепи антитела, раскрытого в данном документе,

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

[0089] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ усиления иммунного ответа у субъекта, при этом способ включает введение субъекту эффективного

количества полиспецифической молекулы, раскрытой в данном документе, 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.

[0090] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения рака у субъекта, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества полиспецифической молекулы, раскрытой в данном документе, 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.

[0091] В определенных вариантах осуществления полиспецифическую молекулу, выделенное антитело, полинуклеотид, вектор, клетку-хозяина или фармацевтическую композицию вводят системно, внутривенно, подкожно, внутрь опухоли или доставляют в дренирующий опухоль лимфатический узел.

[0092] В определенных вариантах осуществления способ дополнительно включает введение дополнительного терапевтического средства субъекту. В конкретном варианте осуществления дополнительным терапевтическим средством является химиотерапевтическое средство. В конкретном варианте 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. В конкретном варианте 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. В конкретном варианте 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.

[0093] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения инфекционного заболевания у субъекта, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества полиспецифической молекулы, раскрытой в данном документе, 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

[0094] **Фиг. 1А - фиг. 1С** представляют собой ряд сенсограмм, на которых продемонстрировано одновременное связывание внеклеточных доменов TIGIT человека и CD96 человека с полиспецифическими молекулами BA123 (фиг. 1А), BA125 (фиг. 1В) и BA127 (фиг. 1С).

[0095] **Фиг. 2А - фиг. 2В** представляют собой графики, на которых продемонстрировано одновременное связывание полиспецифической молекулы к TIGITxCD96 BA127 с клетками СНО, сконструированными для экспрессии TIGIT человека или CD96 человека, по сравнению с контрольными полиспецифическими молекулами BA128, BA131 и BA133. Двойное связывание экспрессируемого клетками TIGIT человека и растворимого His-меченного CD96 человека (фиг. 2А) или экспрессируемого клетками CD96 человека и растворимого His-меченного TIGIT человека (фиг. 2В) определяли посредством проточной цитометрии с применением конъюгированного с флуорохромом (Alex Fluor 488) антитела к His.

[0096] **Фиг. 3А - фиг. 3І** представляют собой ряд графиков, на которых продемонстрировано связывание полиспецифических молекул к TIGITxCD96 BA123 (фиг. 3А), BA125 (фиг. 3В) или BA127 (фиг. 3С) или контрольных полиспецифических молекул BA129 (фиг. 3D), BA130 (фиг. 3E), BA131 (фиг. 3F), BA133 (фиг. 3G), BA134 (фиг. 3H) или BA136 (фиг. 3I) с клетками СНО, сконструированными для экспрессии высоких уровней изоформы 2 CD96 человека на клеточной поверхности, по сравнению с изотипической контрольной полиспецифической молекулой (BA128). Уровни связывания, оцененные по медианной интенсивности флуоресценции (MFI), в каждом случае по сравнению со связыванием клеток СНО с BA128, наносили на график относительно концентраций соответствующего антитела, инкубированного с клетками.

[0097] **Фиг. 4А - фиг. 4І** представляют собой ряд графиков, на которых продемонстрировано связывание полиспецифических молекул к TIGITxCD96 BA123 (фиг. 4А), BA127 (фиг. 4В) или BA125 (фиг. 4С) или контрольных полиспецифических молекул BA129 (фиг. 4D), BA130 (фиг. 4E), BA131 (фиг. 4F), BA133 (фиг. 4G), BA134 (фиг. 4H) или BA136 (фиг. 4I) с клетками СНО, сконструированными для экспрессии высоких уровней изоформы 1 CD96 человека на клеточной поверхности, по сравнению с изотипической контрольной полиспецифической молекулой (BA128). Уровни связывания, оцененные по медианной интенсивности флуоресценции (MFI), в каждом случае по сравнению со связыванием клеток СНО с BA128, наносили на график относительно

концентраций соответствующего антитела, инкубированного с клетками.

[0098] **Фиг. 5А - фиг. 5І** представляют собой ряд графиков, на которых продемонстрировано связывание полиспецифических молекул к TIGITxCD96 ВА123 (фиг. 5А), ВА125 (фиг. 5В) или ВА127 (фиг. 5С) или контрольных полиспецифических молекул ВА129 (фиг. 5D), ВА130 (фиг. 5Е), ВА131 (фиг. 5F), ВА133 (фиг. 5G), ВА134 (фиг. 5H) или ВА136 (фиг. 5I) с клетками СНО, сконструированными для экспрессии высоких уровней изоформы 2 CD96 яванского макака на клеточной поверхности, по сравнению с изотипической контрольной полиспецифической молекулой (ВА128). Уровни связывания, оцененные по медианной интенсивности флуоресценции (MFI), в каждом случае по сравнению со связыванием клеток СНО с ВА128, наносят на график относительно концентраций соответствующего антитела, инкубированного с клетками.

[0099] **Фиг. 6А - фиг. 6І** представляют собой ряд графиков, на которых продемонстрирована блокада связывания CD155 человека-Fc с клетками СНО, сконструированными для экспрессии высоких уровней изоформы 2 CD96 человека на клеточной поверхности, с помощью полиспецифических молекул к TIGITxCD96 ВА123 (фиг. 6А), ВА125 (фиг. 6В) или ВА127 (фиг. 6С) или контрольных полиспецифических молекул ВА129 (фиг. 6D), ВА130 (фиг. 6Е), ВА131 (фиг. 6F), ВА133 (фиг. 6G), ВА134 (фиг. 6H) или ВА136 (фиг. 6I). Уровни связывания CD155-Fc, оцененные по медианной интенсивности флуоресценции (MFI), в каждом случае по сравнению с блокадой изотипической контрольной полиспецифической молекулой (ВА128), наносили на график в виде процента максимального ответа относительно концентраций соответствующего антитела, инкубированного с клетками.

[00100] **Фиг. 7А - фиг. 7І** представляют собой ряд графиков, на которых продемонстрирована блокада связывания CD155 человека-Fc с клетками СНО, сконструированными для экспрессии высоких уровней изоформы 2 CD96 яванского макака на клеточной поверхности, с помощью полиспецифических молекул к TIGITxCD96 ВА123 (фиг. 7А), ВА125 (фиг. 7В) или ВА127 (фиг. 7С) или контрольных полиспецифических молекул ВА129 (фиг. 7D), ВА130 (фиг. 7Е), ВА131 (фиг. 7F), ВА133 (фиг. 7G), ВА134 (фиг. 7H) или ВА136 (фиг. 7I). Уровни связывания CD155-Fc, оцененные по медианной интенсивности флуоресценции (MFI), в каждом случае по сравнению с блокадой изотипической контрольной полиспецифической молекулой (ВА128), наносили на график в виде процента максимального ответа относительно концентраций соответствующей полиспецифической молекулы, инкубированной с клетками.

[00101] **Фиг. 8А - фиг. 8І** представляют собой ряд графиков, на которых продемонстрировано связывание полиспецифических молекул к TIGITxCD96 ВА123 (фиг. 8А), ВА125 (фиг. 8В) или ВА127 (фиг. 8С) или контрольных полиспецифических молекул ВА129 (фиг. 8D), ВА130 (фиг. 8Е), ВА131 (фиг. 8F), ВА133 (фиг. 8G), ВА134 (фиг. 8H) или ВА136 (фиг. 8I) с клетками СНО, сконструированными для экспрессии высоких уровней TIGIT человека на клеточной поверхности. Уровни связывания, оцененные по медианной интенсивности флуоресценции (MFI), в каждом случае по сравнению со

связыванием клеток СНО изотипической контрольной полиспецифической молекулы ВА128, наносили на график относительно концентраций соответствующего антитела, инкубированного с клетками.

[00102] **Фиг. 9А - фиг. 9І** представляют собой ряд графиков, на которых продемонстрировано связывание полиспецифических молекул к TIGITxCD96 ВА123 (фиг. 9А), ВА125 (фиг. 9В) или ВА127 (фиг. 9С) или контрольных полиспецифических молекул ВА129 (фиг. 9D), ВА130 (фиг. 9Е), ВА131 (фиг. 9F), ВА133 (фиг. 9G), ВА134 (фиг. 9H) или ВА136 (фиг. 9I) с клетками СНО, сконструированными для экспрессии высоких уровней TIGIT яванского макака на клеточной поверхности. Уровни связывания, оцененные по медианной интенсивности флуоресценции (MFI), в каждом случае по сравнению со связыванием изотипической контрольной полиспецифической молекулы (ВА128), наносили на график относительно концентраций соответствующего антитела, инкубированного с клетками.

[00103] **Фиг. 10А - фиг. 10І** представляют собой ряд графиков, на которых продемонстрирована блокада связывания CD155 человека-Fc с клетками СНО, сконструированными для экспрессии высоких уровней TIGIT человека на клеточной поверхности, с помощью полиспецифических молекул к TIGITxCD96 ВА123 (фиг. 10А), ВА125 (фиг. 10В) или ВА127 (фиг. 10С) или контрольных полиспецифических молекул ВА129 (фиг. 10D), ВА134 (фиг. 10Е), ВА131 (фиг. 10F), ВА133 (фиг. 10G), ВА130 (фиг. 10H) или ВА136 (фиг. 10I). Уровни связывания CD155-Fc, оцененные по медианной интенсивности флуоресценции (MFI), в каждом случае по сравнению с блокадой изотипической контрольной полиспецифической молекулой (ВА128), наносили на график в виде процента максимального ответа относительно концентраций соответствующего антитела, инкубированного с клетками.

[00104] **Фиг. 11А - фиг. 11І** представляют собой ряд графиков, на которых продемонстрирована блокада связывания CD155 человека-Fc с клетками СНО, сконструированными для экспрессии высоких уровней TIGIT яванского макака на клеточной поверхности, с помощью полиспецифических молекул к TIGITxCD96 ВА123 (фиг. 11А), ВА125 (фиг. 11В) или ВА127 (фиг. 11С) или контрольных полиспецифических молекул ВА129 (фиг. 11D), ВА130 (фиг. 11Е), ВА131 (фиг. 11F), ВА133 (фиг. 11G), ВА134 (фиг. 11H) или ВА136 (фиг. 11I). Уровни связывания CD155-Fc, оцененные по медианной интенсивности флуоресценции (MFI), в каждом случае по сравнению с блокадой изотипической контрольной полиспецифической молекулой (ВА128), наносили на график в виде процента максимального ответа относительно концентраций соответствующего антитела, инкубированного с клетками.

[00105] **Фиг. 12А - фиг. 12І** представляют собой ряд графиков, на которых продемонстрировано связывание полиспецифических молекул к TIGITxCD96 ВА123 (фиг. 12А), ВА125 (фиг. 12В) или ВА127 (фиг. 12С) или контрольных полиспецифических молекул ВА129 (фиг. 12D), ВА130 (фиг. 12Е), ВА131 (фиг. 12F), ВА133 (фиг. 12G), ВА134 (фиг. 12H) или ВА136 (фиг. 12I) с клетками СНО, сконструированными для совместной

экспрессии высоких уровней TIGIT человека на клеточной поверхности и изоформы 2 CD96 человека. Уровни связывания, оцененные по медианной интенсивности флуоресценции (MFI), в каждом случае по сравнению со связыванием изотипической контрольной полиспецифической молекулы (BA128), наносили на график относительно концентраций соответствующего антитела, инкубированного с клетками.

[00106] **Фиг. 13А - фиг. 13I** представляют собой ряд графиков, на которых продемонстрирована блокада связывания CD155 человека-Fc с клетками СНО, сконструированными для совместной экспрессии высоких уровней TIGIT человека и изоформы 2 CD96 человека на клеточной поверхности, с помощью полиспецифических молекул к TIGITxCD96 BA123 (фиг. 13А), BA125 (фиг. 13В) или BA127 (фиг. 13С) или контрольных полиспецифических молекул BA129 (фиг. 13D), BA130 (фиг. 13Е), BA131 (фиг. 13F), BA133 (фиг. 13G), BA134 (фиг. 13H) или BA136 (фиг. 13I). Уровни связывания CD155-Fc, оцененные по медианной интенсивности флуоресценции (MFI), в каждом случае по сравнению с блокадой изотипической контрольной полиспецифической молекулой (BA128), наносили на график в виде процента максимального ответа относительно концентраций соответствующего антитела, инкубированного с клетками.

[00107] **Фиг. 14А - фиг. 14F** представляют собой ряд графиков, на которых продемонстрировано связывание полиспецифических молекул к TIGITxCD96 BA123 (фиг. 14А), BA125 (фиг. 14В) или BA127 (фиг. 14С) или контрольных полиспецифических молекул BA129 (фиг. 14D), BA130 (фиг. 14Е) и BA131 (фиг. 14F) с клетками СНО, сконструированными для экспрессии высоких уровней варианта V/V FcγRIIIa человека на клеточной поверхности. Уровни связывания, оцененные по медианной интенсивности флуоресценции (MFI), наносили на график относительно концентраций соответствующего антитела, инкубированного с клетками.

[00108] **Фиг. 15А - фиг. 15F** представляют собой ряд графиков, на которых продемонстрировано связывание полиспецифических молекул к TIGITxCD96 BA123 (фиг. 15А), BA125 (фиг. 15В) или BA127 (фиг. 15С) или контрольных полиспецифических молекул BA129 (фиг. 15D), BA130 (фиг. 15Е) и BA131 (фиг. 15F) с клетками СНО, сконструированными для экспрессии высоких уровней варианта F/F FcγRIIIa человека на клеточной поверхности. Уровни связывания, оцененные по медианной интенсивности флуоресценции (MFI), наносили на график относительно концентраций соответствующего антитела, инкубированного с клетками.

[00109] **Фиг. 16А - фиг. 16С** представляют собой ряд графиков, на которых продемонстрировано связывание антител к CD96 BA143 (фиг. 16А), BA144 (фиг. 16В), BA145 (фиг. 16С), по сравнению с изотипическим контрольным антителом (BA146), с клетками СНО, сконструированными для экспрессии высоких уровней изоформы 2 CD96 человека на клеточной поверхности. Уровни связывания, оцененные по медианной интенсивности флуоресценции (MFI), в каждом случае по сравнению со связыванием клеток СНО с BA146, наносили на график относительно концентраций соответствующего антитела, инкубированного с клетками.

[00110] **Фиг. 17А - фиг. 17С** представляют собой ряд графиков, на которых продемонстрировано связывание антител к CD96 ВА143 (фиг. 17А), ВА144 (фиг. 17В), ВА145 (фиг. 17С), по сравнению с изотипическим контрольным антителом (ВА146), с клетками СНО, сконструированными для экспрессии высоких уровней изоформы 2 CD96 яванского макака на клеточной поверхности. Уровни связывания, оцененные по медианной интенсивности флуоресценции (MFI), в каждом случае по сравнению со связыванием клеток СНО с ВА146, наносили на график относительно концентраций соответствующего антитела, инкубированного с клетками.

[00111] **Фиг. 18А - фиг. 18С** представляют собой ряд графиков, на которых продемонстрирована блокада связывания CD155-Fc человека с клетками СНО, сконструированными для экспрессии высоких уровней изоформы 2 CD96 человека на клеточной поверхности, с помощью антител к CD96 ВА143 (фиг. 18А), ВА144 (фиг. 18В) и ВА145 (фиг. 18С). Уровни связывания CD155-Fc, оцененные по медианной интенсивности флуоресценции (MFI), в каждом случае по сравнению с блокадой изотипическим контрольным антителом (ВА146), наносили на график в виде процента максимального ответа относительно концентраций соответствующего антитела, инкубированного с клетками.

[00112] **Фиг. 19А - фиг. 19С** представляют собой ряд графиков, на которых продемонстрирована блокада связывания CD155-Fc человека с клетками СНО, сконструированными для экспрессии высоких уровней изоформы 2 CD96 яванского макака на клеточной поверхности, с помощью антител к CD96 ВА143 (фиг. 19А), ВА144 (фиг. 19В) и ВА145 (фиг. 19С). Уровни связывания CD155-Fc, оцененные по медианной интенсивности флуоресценции (MFI), в каждом случае по сравнению с блокадой изотипическим контрольным антителом (ВА146), наносили на график в виде процента максимального ответа относительно концентраций соответствующего антитела, инкубированного с клетками.

[00113] **Фиг. 20** представляет собой график, на котором продемонстрировано связывание антитела IgG₁ к TIGIT ВА148, по сравнению с изотипическим контрольным антителом (ВА149), с клетками СНО, сконструированными для экспрессии высоких уровней TIGIT человека на клеточной поверхности. Уровни связывания, оцененные по медианной интенсивности флуоресценции (MFI), в каждом случае по сравнению со связыванием клеток СНО с ВА149, наносили на график относительно концентраций соответствующего антитела, инкубированного с клетками.

[00114] **Фиг. 21** представляет собой график, на котором продемонстрировано связывание антитела к TIGIT ВА148, по сравнению с изотипическим контрольным антителом (ВА149), с клетками СНО, сконструированными для экспрессии высоких уровней TIGIT яванского макака на клеточной поверхности. Уровни связывания, оцененные по медианной интенсивности флуоресценции (MFI), в каждом случае по сравнению со связыванием клеток СНО с ВА149, наносили на график относительно концентраций соответствующего антитела, инкубированного с клетками.

[00115] **Фиг. 22** представляет собой график, на котором продемонстрирована блокада связывания CD155-Fc человека с клетками CHO, сконструированными для экспрессии высоких уровней TIGIT человека, с помощью антитела к TIGIT BA148. Уровни связывания CD155-Fc, оцененные по медианной интенсивности флуоресценции (MFI), по сравнению с блокадой изотипическим контрольным антителом (BA149), наносили на график в виде процента максимального ответа относительно концентраций соответствующего антитела, инкубированного с клетками.

[00116] **Фиг. 23** представляет собой график, на котором продемонстрирована блокада связывания CD155-Fc человека с клетками CHO, сконструированными для экспрессии высоких уровней TIGIT яванского макака, с помощью антитела к TIGIT BA148. Уровни связывания CD155-Fc, оцененные по медианной интенсивности флуоресценции (MFI), по сравнению с блокадой изотипическим контрольным антителом (BA149), наносили на график в виде процента максимального ответа относительно концентраций соответствующего антитела, инкубированного с клетками.

[00117] **Фиг. 24A - фиг. 24D** представляют собой ряд графиков, на которых продемонстрировано связывание антитела к TIGIT BA148 и антител к CD96 BA143, BA144 и BA145 с клетками CHO, сконструированными для экспрессии высоких уровней варианта V/V FcγRIIIa человека на клеточной поверхности. Уровни связывания BA143 (фиг. 24A), BA144 (фиг. 24B), BA145 (фиг. 24C) и BA148 (фиг. 24D), оцененные по медианной интенсивности флуоресценции (MFI), наносили на график относительно концентраций соответствующего антитела, инкубированного с клетками.

[00118] **Фиг. 25A - фиг. 25D** представляют собой ряд графиков, на которых продемонстрировано связывание антитела IgG₁ к TIGIT BA148 и антител IgG₁ WT к CD96 BA143, BA144 и BA145 с клетками CHO, сконструированными для экспрессии высоких уровней варианта F/F FcγRIIIa человека на клеточной поверхности. Уровни связывания BA143 (фиг. 25A), BA144 (фиг. 25B), BA145 (фиг. 25C) и BA148 (фиг. 25D), оцененные по медианной интенсивности флуоресценции (MFI), наносили на график относительно концентраций соответствующего антитела, инкубированного с клетками.

[00119] **Фиг. 26A - фиг. 26F** представляют собой ряд графиков, на которых продемонстрирована способность BA127, BA143, BA148 или BA128 связываться с активированными Т-клетками человека у трех разных доноров. Связывание с CD4⁺ Т-клетками (фиг. 26A, фиг. 26B и фиг. 26C) и CD8⁺ Т-клетками (фиг. 26D, фиг. 26E и фиг. 26F), оцененное по медианной интенсивности флуоресценции (MFI), наносили на график относительно концентраций соответствующего антитела, инкубированного с клетками.

[00120] **Фиг. 27A - фиг. 27F** представляют собой ряд графиков, на которых продемонстрирована способность BA127 или BA128 связываться с активированными Т-клетками человека у трех разных доноров. Связывание с CD4⁺ Т-клетками (фиг. 27A, фиг. 27B и фиг. 27C) и CD8⁺ Т-клетками (фиг. 27D, фиг. 27E и фиг. 27F), оцененное по медианной интенсивности флуоресценции (MFI), наносили на график относительно концентраций соответствующего антитела, инкубированного с клетками.

[00121] **Фиг. 28А - фиг. 28С** представляют собой ряд графиков, на которых продемонстрирована способность полиспецифических молекул ВА123, ВА125, ВА127, ВА128, ВА129, ВА130 и ВА131 облегчать секрецию IL-2 SEA-стимулированными РВМС от одного донора в диапазоне концентраций полиспецифических молекул. Каждая панель представляет собой независимый эксперимент с использованием одного и того же донора.

[00122] **Фиг. 29** представляет собой график, на котором продемонстрирована способность полиспецифических молекул ВА127 и ВА128 и антител ВА143 и ВА148 облегчать секрецию IL-2 SEA-стимулированными РВМС от одного донора в диапазоне концентраций полиспецифических молекул.

[00123] **Фиг. 30А - фиг. 30F** представляют собой ряд графиков, на которых продемонстрирована способность ВА127 и ВА128 облегчать секрецию IL-2 SEA-стимулированными РВМС от шести разных доноров в диапазоне концентраций антител.

[00124] **Фиг. 31А - фиг. 31В** представляют собой графики, на которых продемонстрирована способность ВА125, ВА127, ВА128 и ВА133 (фиг. 31А) и ВА127, ВА143, ВА146, моноспецифического эталонного антитела 1 к TIGIT и моноспецифического эталонного антитела 2 к TIGIT (фиг. 31В) блокировать связывание TIGIT, экспрессированного на клетках Jurkat, с CD155, экспрессированным на клетках СНО. **Фиг. 31С** представляет собой график, на котором продемонстрирована способность ВА127, ВА131, ВА128 и эталонного антитела 3 к TIGIT блокировать связывание TIGIT, экспрессированного на клетках Jurkat, с CD155, экспрессированным на клетках СНО. Блокирование выражается в виде кратности изменения NFAT-люциферазного сигнала в диапазоне концентраций антител.

[00125] **Фиг. 32А - фиг. 32В** представляют собой графики, на которых продемонстрирована способность полиспецифической молекулы к TIGITxCD96 ВА127, эталонного антитела к TIGIT и изотопического контрольного антитела вызывать секрецию цитокина IL-2 в первичных РВМС человека от здорового донора, стимулированных субоптимальной концентрацией суперантигена SEA от двух доноров в диапазоне концентраций.

[00126] **Фиг. 33А - фиг. 33Е** представляют собой ряд графиков, на которых продемонстрирован объем опухоли с течением времени в мышинной модели колоректальной карциномы, где мышам вводили биспецифический изотипический контроль (фиг. 33А), мышинное суррогатное моноспецифическое антитело к TIGIT (фиг. 33В), мышинное суррогатное моноспецифическое антитело к CD96 (фиг. 33С), оба из мышинных суррогатных моноспецифических антител к TIGIT и к CD96 (фиг. 33D) или мышиную суррогатную полиспецифическую молекулу к TIGITxCD96 (фиг. 33Е).

[00127] **Фиг. 34А** представляет собой график, на котором продемонстрирован средний объем опухоли с течением времени в мышинной модели колоректальной карциномы, где мышам вводили оба из мышинных суррогатных моноспецифических антител к TIGIT и к CD96, мышиную суррогатную полиспецифическую молекулу к TIGITxCD96, подвергнутую сайленсингу Fc мышиную суррогатную полиспецифическую

молекулу к TIGITxCD96 или изотипический контроль. **Фиг. 34В - фиг. 34Е** представляют собой ряд графиков, на которых продемонстрированы отдельные значения объема опухоли с течением времени для каждой отдельной мыши, которой вводили оба из мышинных суррогатных моноспецифических антител к TIGIT и к CD96 (фиг. 34С), мышиную суррогатную полиспецифическую молекулу к TIGITxCD96 (фиг. 34D), подвергнутую сайленсингу Fc мышиную суррогатную полиспецифическую молекулу к TIGITxCD96 (фиг. 34Е) или изотипический контроль (фиг. 34В).

7. ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[00128] В настоящем изобретении предусмотрены полиспецифические молекулы, которые специфически связываются с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), и выделенные антитела к TIGIT. Также предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие данные полиспецифические молекулы и антитела, нуклеиновые кислоты, кодирующие данные полиспецифические молекулы и антитела, векторы экспрессии и клетки-хозяева для получения данных полиспецифических молекул и антител и способы лечения субъекта с применением данных полиспецифических молекул и антител. Полиспецифические молекулы и антитела, раскрытые в данном документе, особенно применимы для повышения активации иммунных клеток и, следовательно, применимы для лечения рака у субъекта или лечения или предупреждения инфекционного заболевания у субъекта.

7.1 Определения

[00129] Применяемый в данном документе термин «CD96» относится к кластеру дифференцировки 96, также известному как TACTILE (белок активации Т-клеток, с повышенной поздней экспрессией), который у людей кодируется геном CD96. Применяемый в данном документе термин «CD96 человека» относится к белку CD96, кодируемому геном CD96 человека дикого типа (например, с номером доступа в GenBank™ NM_005816.5), его фрагментом или вариантом. Иллюстративные внеклеточные части CD96 человека представлены в данном документе под SEQ ID NO: 61-65. Иллюстративные внеклеточные части CD96 яванского макака представлены в данном документе под SEQ ID NO: 66, 111 и 112.

[00130] Применяемый в данном документе термин «TIGIT» относится к Т-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. Иллюстративные аминокислотные последовательности внеклеточного домена зрелого белка TIGIT человека и белка TIGIT яванского макака представлены под SEQ ID NO: 113 и 114 соответственно.

[00131] Применяемые в данном документе «полиспецифические молекулы» представляют собой молекулы, которые содержат две или более антигенсвязывающих

областей, которые специфически связываются с разными антигенами.

[00132] Применяемая в данном документе «антигенсвязывающая область» относится к части полиспецифической молекулы или антитела, которая содержит аминокислотные остатки, которые придают полиспецифической молекуле или антителу их специфичность в отношении антигена. Примеры антигенсвязывающих областей включают определяющие комплементарность области (CDR), переменные области тяжелой цепи, переменные области легкой цепи, тяжелые цепи, легкие цепи антитела и любой их фрагмент. Антигенсвязывающая область может быть получена от любого вида животного, такого как грызуны (например, мышь, крыса или хомяк), и людей.

[00133] 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.

[00134] «Полиспецифические антитела» представляют собой антитела (например, биспецифические антитела), которые специфически связываются с двумя или более различными антигенами или с двумя или более различными 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.

[00135] 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. CDRH1, CDRH2 и CDRH3 обозначают CDR тяжелой цепи, а CDRL1, CDRL2 и CDRL3 обозначают CDR легкой цепи.

[00136] Применяемые в данном документе термины «переменная область» и «переменный домен» используются взаимозаменяемо и они общеизвестны в данной области техники. Переменная область обычно относится к части антитела, обычно к части легкой или тяжелой цепи, как правило к приблизительно 110-120 аминоконцевым 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 переменной 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 переменная область является человеческой переменной областью. В определенных вариантах осуществления переменная область содержит CDR грызуна или мыши и человеческие каркасные области (FR). В определенных вариантах осуществления переменная область является переменной областью примата (например, отличного от человека примата). В определенных вариантах

осуществления вариабельная область содержит CDR грызуна или мыши и каркасную область (FR) примата (например, отличного от человека примата).

[00137] Применяемые в данном документе термины «VH» и «VL» относятся к вариабельным 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.

[00138] 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).

[00139] 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.

[00140] 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.

[00141] 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.

[00142] 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.

[00143] 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.

[00144] 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.

[00145] 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.

[00146] 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.

[00147] 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.

[00148] 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 Полиспецифические молекулы, которые связываются с CD96 и/или TIGIT, и антитела к TIGIT

[00149] В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрены полиспецифические молекулы, которые специфически связываются с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака). Например, полиспецифическая молекула, предусмотренная в данном документе, может содержать первую антигенсвязывающую область, которая связывается с CD96, и вторую антигенсвязывающую область, которая связывается с антигеном, отличным от CD96. Полиспецифическая молекула, предусмотренная в данном

документе, также может содержать первую антигенсвязывающую область, которая связывается с антигеном, отличным от TIGIT, и вторую антигенсвязывающую область, которая связывается с TIGIT. Также в данном документе предусмотрены полиспецифические молекулы, которые содержат первую антигенсвязывающую область, которая связывается с CD96, и вторую антигенсвязывающую область, которая связывается с TIGIT. Аминокислотные последовательности иллюстративных антигенсвязывающих областей для CD96 и антигенсвязывающих областей для TIGIT представлены в таблице 1 и таблице 2 соответственно.

[00150] В другом 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 2.

Таблица 1. Аминокислотные последовательности иллюстративных антигенсвязывающих областей для CD96.

Описание	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
Тяжелая цепь BA137	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGIS WVRQAPGQGLEWMGWISAYNANTNYAQKLQGRV TMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARSAGVL GGMDVWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG	1
Легкая цепь BA137, BA145	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVNAYLAWY QKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTL TISLQSEDFAVYYCQYNNWPSFGGQTKLEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	2
Тяжелая цепь BA138	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYAVH	3

	<p>WVRQAPGQRLEWMGWINTGNANTKYSQKFQGRVT ITRDTASTAYMELSSLRSEDТАVYYCARSЛGVYYG MDVWGQGTТVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>	
<p>Легкая цепь BA138, BA144</p>	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSVSTFLNWIYQ QKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGGTDFLTI SSLQPEDFATYYCLQTYISIPYTFGQGTKLEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>	4
<p>Тяжелая цепь BA139</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYALH WVRQAPGQRLEWMGWINTGSGDTKYSQKFQGRVTI TRDTASTAYMELSSLRSEDТАVYYCARSЛGVYYG MDVWGQGTЛVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>	5
<p>Легкая цепь BA139, BA143</p>	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNIYQ QKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGGTDFLTI SSLQPEDFATYYCQQSYSTPKITFGQGTKLEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW</p>	6

	KVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
HCDR1 BA137, BA145	SYGIS	10
HCDR2 BA137, BA145	WISAYNANTNYAQKLQG	11
HCDR3 BA137, BA145	SAGVLGGMDV	12
LCDR1 BA137, BA145	RASQSVNAYLA	13
LCDR2 BA137, BA145	GASTRAT	14
LCDR3 BA137, BA145	QQYNNWPS	15
HCDR1 BA138, BA144	NYAVH	16
HCDR2 BA138, BA144	WINTGNANTKYSQKFQG	17
HCDR3 BA138, BA144	SLGVYYGMDV	18
LCDR1 BA138, BA144	RASQSVSTFLN	19
LCDR2 BA138, BA144	AASSLQS	20
LCDR3 BA138, BA144	LQYYSIPYT	21
HCDR1 BA139, BA143	TYALH	22
HCDR2 BA139, BA143	WINTGSGDTKYSQKFQG	23
HCDR3 BA139, BA143	SLGVYYGMDV	24
LCDR1 BA139, BA143	RASQSISSYLN	25

LCDR2 BA139, BA143	AASSLQS	26
LCDR3 BA139, BA143	QQSYSTPKIT	27
VH BA137, BA145	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGIS WVRQAPGQGLEWMGWISAYNANTNYAQKLQGRV TMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARSAGVL GGMDVWGRGTLVTVSS	34
VL BA137, BA145	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVNAYLAWY QQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTL TISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPSFGQGTKLEIK	35
VH BA138, BA144	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYAVH WVRQAPGQRLEWMGWINTGNANTKYSQKFQGRVT ITRDTASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSLGVYYG MDVWGQGTTVTVSS	36
VL BA138, BA144	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVSTFLNWFYQ QKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCLQTYISIPYTFGQGTKLEIK	37
VH BA139, BA143	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYALH WVRQAPGQRLEWMGWINTGSGDTKYSQKFQGRVTI TRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSLGVYYG MDVWGQGTTLVTVSS	38
VL BA139, BA143	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWFYQ QKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQSYSTPKITFGQGTKLEIK	39
Константная область легкой цепи BA137, BA138, BA139, BA143, BA144, BA145	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	42
Тяжелая цепь BA137a	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGIS WVRQAPGQGLEWMGWISAYNANTNYAQKLQGRV TMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARSAGVL GGMDVWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG	67

	<p>GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>	
Тяжелая цепь BA137b	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGIS WVRQAPGQGLEWMGWISAYNANTNYAQKLQGRV TMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARSAGVL GGMDVWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>	68
Тяжелая цепь BA137c	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGIS WVRQAPGQGLEWMGWISAYNANTNYAQKLQGRV TMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARSAGVL GGMDVWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>	69

Тяжелая цепь BA137d	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGIS WVRQAPGQGLEWMGWISAYNANTNYAQKLQGRV TMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARSAGVL GGMDVWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>	70
Тяжелая цепь BA137e	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGIS WVRQAPGQGLEWMGWISAYNANTNYAQKLQGRV TMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARSAGVL GGMDVWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>	71
Тяжелая цепь BA137f	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGIS WVRQAPGQGLEWMGWISAYNANTNYAQKLQGRV TMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARSAGVL GGMDVWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK</p>	72

	EYKCKVSNKALPAPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	
Тяжелая цепь BA137g	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGIS WVRQAPGQGLEWMGWISAYNANTNYAQKLQGRV TMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARSAGVL GGMDVWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	73
Тяжелая цепь BA137h	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGIS WVRQAPGQGLEWMGWISAYNANTNYAQKLQGRV TMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARSAGVL GGMDVWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG	74
Тяжелая цепь BA137i	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGIS WVRQAPGQGLEWMGWISAYNANTNYAQKLQGRV TMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARSAGVL GGMDVWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV	75

	LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG	
Тяжелая цепь BA137j	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGIS WVRQAPGQGLEWMGWISAYNANTNYAQKLQGRV TMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARSAGVL GGMDVWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG	76
Тяжелая цепь BA137k	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGIS WVRQAPGQGLEWMGWISAYNANTNYAQKLQGRV TMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARSAGVL GGMDVWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG	77
Тяжелая цепь BA145	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGIS	45

	<p>WVRQAPGQGLEWMGWISAYNANTNYAQKLQGRV TMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARSAGVL GGMDVWGRGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	
Тяжелая цепь BA138a	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYAVH WVRQAPGQRLEWMGWINTGNANTKYSQKFQGRVT ITRDTASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSLGVYYG MDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>	78
Тяжелая цепь BA138b	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYAVH WVRQAPGQRLEWMGWINTGNANTKYSQKFQGRVT ITRDTASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSLGVYYG MDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE</p>	79

	EMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG	
Тяжелая цепь BA138c	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYAVH WVRQAPGQRLEWMGWINTGNANTKYSQKFQGRVT ITRDTASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSLGVYYG MDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG	80
Тяжелая цепь BA138d	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYAVH WVRQAPGQRLEWMGWINTGNANTKYSQKFQGRVT ITRDTASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSLGVYYG MDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG	81
Тяжелая цепь BA138e	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYAVH WVRQAPGQRLEWMGWINTGNANTKYSQKFQGRVT ITRDTASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSLGVYYG MDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD	82

	KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG	
Тяжелая цепь BA138f	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYAVH WVRQAPGQRLEWMGWINTGNANTKYSQKFQGRVT ITRDTASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSLGVYYG MDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG	83
Тяжелая цепь BA138g	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYAVH WVRQAPGQRLEWMGWINTGNANTKYSQKFQGRVT ITRDTASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSLGVYYG MDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG	84
Тяжелая цепь BA138h	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYAVH WVRQAPGQRLEWMGWINTGNANTKYSQKFQGRVT	85

	<p>ITRDTSASTAYMELSSLRSEDТАVYYCARSЛGVYYG MDVWGQGTТVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>	
<p>Тяжелая цепь BA138i</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYAVH WVRQAPGQRLEWMGWINTGNANTKYSQKFQGRVT ITRDTSASTAYMELSSLRSEDТАVYYCARSЛGVYYG MDVWGQGTТVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>	<p>86</p>
<p>Тяжелая цепь BA138j</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYAVH WVRQAPGQRLEWMGWINTGNANTKYSQKFQGRVT ITRDTSASTAYMELSSLRSEDТАVYYCARSЛGVYYG MDVWGQGTТVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY</p>	<p>87</p>

	KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG	
Тяжелая цепь BA138k	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYAVH WVRQAPGQRLEWMGWINTGNANTKYSQKFQGRVT ITRDTASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSLGVYYG MDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPLPEEKTKISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG	88
Тяжелая цепь BA144	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYAVH WVRQAPGQRLEWMGWINTGNANTKYSQKFQGRVT ITRDTASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSLGVYYG MDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK	46
Тяжелая цепь BA139a	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYALH WVRQAPGQRLEWMGWINTGSGDTKYSQKFQGRVTI TRDTASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSLGVYYG MDVWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD	89

	<p> TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG </p>	
<p> Тяжелая цепь BA139b </p>	<p> QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYALH WVRQAPGQRLEWMGWINTGSGDTKYSQKFQGRVTI TRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSLGVYYG MDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG </p>	90
<p> Тяжелая цепь BA139c </p>	<p> QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYALH WVRQAPGQRLEWMGWINTGSGDTKYSQKFQGRVTI TRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSLGVYYG MDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG </p>	91
<p> Тяжелая цепь BA139d </p>	<p> QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYALH WVRQAPGQRLEWMGWINTGSGDTKYSQKFQGRVTI TRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSLGVYYG </p>	92

	<p>MDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>	
<p>Тяжелая цепь BA139e</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYALH WVRQAPGQRLEWMGWINTGSGDTKYSQKFQGRVTI TRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSLGVVYG MDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>	<p>93</p>
<p>Тяжелая цепь BA139f</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYALH WVRQAPGQRLEWMGWINTGSGDTKYSQKFQGRVTI TRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSLGVVYG MDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV</p>	<p>94</p>

	MHEALHNHYTQKSLSLSPG	
Тяжелая цепь BA139g	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYALH WVRQAPGQRLEWMGWINTGSGDTKYSQKFQGRVTI TRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSLGVYYG MDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPLPEEKTKISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>	95
Тяжелая цепь BA139h	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYALH WVRQAPGQRLEWMGWINTGSGDTKYSQKFQGRVTI TRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSLGVYYG MDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>	96
Тяжелая цепь BA139i	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYALH WVRQAPGQRLEWMGWINTGSGDTKYSQKFQGRVTI TRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSLGVYYG MDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV</p>	97

	<p>HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>	
Тяжелая цепь BA139j	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYALH WVRQAPGQRLEWMGWINTGSGDTKYSQKFQGRVTI TRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSLGVVYG MDVWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>	98
Тяжелая цепь BA139k	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYALH WVRQAPGQRLEWMGWINTGSGDTKYSQKFQGRVTI TRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSLGVVYG MDVWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>	99
Тяжелая цепь BA143	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYALH WVRQAPGQRLEWMGWINTGSGDTKYSQKFQGRVTI TRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSLGVVYG MDVWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT</p>	47

	<p>AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	
<p>Константная область тяжелой цепи BA137a, BA138a, BA139a</p>	<p>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDGSFFLV SKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG</p>	49
<p>Константная область тяжелой цепи BA137, BA138, BA139</p>	<p>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDGSFFLV SKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG</p>	50
<p>Константная область тяжелой цепи BA137b, BA138b, BA139b</p>	<p>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEEK</p>	51

	TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLV SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG	
Константная область тяжелой цепи BA137c, BA138c, BA139c	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLV SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG	52
Константная область тяжелой цепи BA137d, BA138d, BA139d	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG	53
Константная область тяжелой цепи BA137e, BA138e, BA139e	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG	54
Константная область	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV	55

<p>тяжелой цепи BA137f, BA138f, BA139f</p>	<p>TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAAPEEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG</p>	
<p>Константная область тяжелой цепи BA137g, BA138g, BA139g</p>	<p>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG</p>	56
<p>Константная область тяжелой цепи BA137h, BA138h, BA139h</p>	<p>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG</p>	57
<p>Константная область тяжелой цепи BA137i, BA138i, BA139i</p>	<p>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK</p>	58

	TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG	
Константная область тяжелой цепи BA137j, BA138j, BA139j	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG	59
Константная область тяжелой цепи BA137k, BA138k, BA139k	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG	60

Таблица 2. Аминокислотные последовательности иллюстративных антигенсвязывающих областей для TIGIT и антител к TIGIT.

Описание	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
Тяжелая цепь BA142, BA150	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKKASGYTFASYGIS WVRQAPGQGLEWMGGITPFFNRVDVAEKFKQGRVT ITADKSTSTAYIELSSLRSEDVAVYYCARDLRRGGV GDAFDIWGRGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFL	7

	FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	
Легкая цепь BA142	QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSPDVGSHAYRS WYQQHPGKAPKLMIEVSYPSPGVSNRFSGSKSG NTASLTISGLQAEDEADYYCSSYPPSSATVFGAGTK LTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD FYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKY AASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVA PTECS	8
Легкая цепь BA150, BA148	QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSPDVGSHAYRS WYQQHPGKAPKLMIEVSYPSPGVSNRFSGSKSG NTASLTISGLQAEDEADYYCSSYPPSSATVFGAGTK LTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISD FYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKY AASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVA PTEC	9
HCDR1 BA142, BA150, BA148	SYGIS	28
HCDR2 BA142, BA150, BA148	GITPFFNRVDVAEKFQG	29
HCDR3 BA142, BA150, BA148	DLRRGGVGDAFDI	30
LCDR1 BA142, BA150, BA148	TGTSPDVGSHAYRS	31
LCDR2 BA142, BA150, BA148	EVSYPSPG	32
LCDR3 BA142, BA150, BA148	SSYPPSSATV	33
VH BA142, BA150, BA148	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFASYGIS WVRQAPGQGLEWMGGITPFFNRVDVAEKFQGRVT	40

	ITADKSTSTAYIELSSLRSEDТАVYYCARDLRRGGV GDAFDIWGRGTLTVSS	
VL BA142, BA150, BA148	QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSPDVGSHAYRS WYQQHPGKAPKLMIEVSYRPSGVSНRFSGSKSG NTASLTISGLQAЕDEADYYCSSYPPSSATVFGAGTK LTVL	41
Константная область легкой цепи BA142	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPG AVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASS YLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC S	43
Константная область легкой цепи BA150, BA148	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPG AVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASS YLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC	44
Тяжелая цепь BA142d, BA150d	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFASYGIS WVRQAPGQGLEWMGGITPFFNRVDVAEKFQGRVT ITADKSTSTAYIELSSLRSEDТАVYYCARDLRRGGV GDAFDIWGRGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	100
Тяжелая цепь BA142e, BA150e	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFASYGIS WVRQAPGQGLEWMGGITPFFNRVDVAEKFQGRVT ITADKSTSTAYIELSSLRSEDТАVYYCARDLRRGGV GDAFDIWGRGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ	101

	DWLNKKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	
Тяжелая цепь BA142f, BA150f	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFASYGIS WVRQAPGQGLEWMGGITPFFNRVDVAEKFQGRVT ITADKSTSTAYIELSSLRSEDNAVYYCARDLRRGGV GDAFDIWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNKKEYKCKVSNKALPAPEEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	102
Тяжелая цепь BA142a, BA150a	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFASYGIS WVRQAPGQGLEWMGGITPFFNRVDVAEKFQGRVT ITADKSTSTAYIELSSLRSEDNAVYYCARDLRRGGV GDAFDIWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	103
Тяжелая цепь BA142g, BA150g	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFASYGIS WVRQAPGQGLEWMGGITPFFNRVDVAEKFQGRVT ITADKSTSTAYIELSSLRSEDNAVYYCARDLRRGGV GDAFDIWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP	104

	AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	
Тяжелая цепь BA142b, BA150b	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFASYGIS WVRQAPGQGLEWMGGITPFFNRVDVAEKFQGRVT ITADKSTSTAYIELSSLRSEDVAVYYCARDLRRGGV GDAFDIWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPEEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	105
Тяжелая цепь BA142c, BA150c	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFASYGIS WVRQAPGQGLEWMGGITPFFNRVDVAEKFQGRVT ITADKSTSTAYIELSSLRSEDVAVYYCARDLRRGGV GDAFDIWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	106
Тяжелая цепь BA142h,	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFASYGIS	107

BA150h	<p>WVRQAPGQGLEWMGGITPFFNRVDVAEKFQGRVT ITADKSTSTAYIELSSLRSEDТАVYYCARDLRRGGV GDAFDIWGRGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>	
Тяжелая цепь BA142i, BA150i	<p>EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFASYGIS WVRQAPGQGLEWMGGITPFFNRVDVAEKFQGRVT ITADKSTSTAYIELSSLRSEDТАVYYCARDLRRGGV GDAFDIWGRGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>	108
Тяжелая цепь BA142j, BA150j	<p>EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFASYGIS WVRQAPGQGLEWMGGITPFFNRVDVAEKFQGRVT ITADKSTSTAYIELSSLRSEDТАVYYCARDLRRGGV GDAFDIWGRGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNQKEYKCKVSNKALPAPEEKTISKAKGQPREP</p>	109

	<p>QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>	
<p>Тяжелая цепь BA142k, BA150k</p>	<p>EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFASYGIS WVRQAPGQGLEWMGGITPFFNRVDVAEKFKQGRVT ITADKSTSTAYIELSSLRSEDVAVYYCARDLRRGGV GDAFDIWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>	110
<p>Тяжелая цепь BA148</p>	<p>EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFASYGIS WVRQAPGQGLEWMGGITPFFNRVDVAEKFKQGRVT ITADKSTSTAYIELSSLRSEDVAVYYCARDLRRGGV GDAFDIWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	48
<p>Константная область тяжелой цепи BA142a, BA150a</p>	<p>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK</p>	49

	ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG	
Константная область тяжелой цепи BA142g, BA150g	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG	50
Константная область тяжелой цепи BA142b, BA150b	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG	51
Константная область тяжелой цепи BA142c, BA150c	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG	52
Константная область	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP	53

<p>тяжелой цепи BA142d, BA150d</p>	<p>VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LSDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG</p>	
<p>Константная область тяжелой цепи BA142e, BA150e</p>	<p>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LSDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG</p>	54
<p>Константная область тяжелой цепи BA142f, BA150f</p>	<p>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LSDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG</p>	55
<p>Константная область тяжелой цепи BA142, BA150</p>	<p>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK</p>	56

	ALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG	
Константная область тяжелой цепи BA142h, BA150h	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG	57
Константная область тяжелой цепи BA142i, BA150i	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG	58
Константная область тяжелой цепи BA142j, BA150j	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG	59
Константная область	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP	60

тяжелой цепи BA142k, BA150k	VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LQSDGTSFLLYSLKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG	
--------------------------------	--	--

Таблица 3. Иллюстративные последовательности CD96.

Описание	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
Иллюстративная последовательность ¹ изоформы 1 внеклеточного домена CD96 человека	VWEKTVNTEENVYATLGSDVNLTCQTQTVGFFVQ MQWSKVTNKIDLIAVYHPQYGFYCA YGRPCESLVT FTETPENGSKWTLHLRNMSCSVSGRYECMLVLYPE GIQTKIYNLLIQTHVTADEWNSNHTIEIEINQ TLEIPCF QNSSSKISSEFTYAWSVENSSTDSWVLLSKGIKEDNG TQETLISQNHLSNSTLLKDRVKLGT DYRLHLSPVQIF DDGRKF SCHIRVGPNKILRSSTTVKVFAKPEIPVIVEN NSTDVLVERRFTCLLKNVFPKANITWFIDGSFLHDEK EGIYITNEERKKGKDG FLELKS VLTRVHSNKPAQSDN LTIWCMALSPVPGNKVWNISSEKITFLLGSEISSTDP LSVTESTLDTQPSPASSVSPARYPATSSVTLVDVSAL RPNTTPQPSNSSMTTRGFNYPWTSSGTDTKKSVSRIP SETYSSSPSGAGSTLHDNVFTSTARAFSEVPTTANGS TKTNHVHITGIVVNKPKDGM	61
Иллюстративная последовательность ² изоформы 1 внеклеточного домена CD96 человека	VWEKTVNTEENVYATLGSDVNLTCQTQTVGFFVQ MQWSKVTNKIDLIAVYHPQYGFYCA YGRPCESLVT FTETPENGSKWTLHLRNMSCSVSGRYECMLVLYPE GIQTKIYNLLIQTHVTADEWNSNHTIEIEINQ TLEIPCF QNSSSKISSEFTYAWSVEDNGTQETLISQNHLSNSTL LKDRVKLGT DYRLHLSPVQIFDDGRKF SCHIRVGPN KILRSSTTVKVFAKPEIPVIVENNSTDVLVERRFTCLL KNVFPKANITWFIDGSFLHDEKEGIYITNEERKKGKDG FLELKS VLTRVHSNKPAQSDN LTIWCMALSPVPGNK	62

	VWNISSEKITFLLGSEISSTDPPLSVTESTLDTQPSPAS SVSPARYPATSSVTLVDVVSALRPNTTPQPSNSSMTTR GFNYPWTSSGTDTKKSVSRIPSETYSSSPSGAGSTLH DNVFTSTARAFSEVPTTANGSTKTNHVHITGIVVNKP KDGM	
Иллюстративная C89S ¹ изоформы 2 внеклеточного домена CD96 человека	VWEKTVNTEENVYATLGSDVNLTCQTQTVGFFVQ MQWSKVTNKIDLIAVYHPQYGFYCA YGRPCESLVT FTETPENGSKWTLHLRNMSSSVSGRYECMLVLYPEG IQTKIYNLLIQTHVTADEWNSNHTIEIEINQTLEIPCFQ NSSSKISSEFTYAWSVEDNGTQETLISQNHLLISNSTLL KDRVCLGTDYRLHLSVPVQIFDDGRKF SCHIRVGP NKI LRSSTTVKVF AKPEIPVIVENNSTDV LVERRFTCLLK NVFPKANITWFIDGSFLHDEKEGIYITNEERK GKDG F LELKS VLTRVHSNKPAQSDNLT IWCMALSPVPGNKV WNISSEKITFLLGSEISSTDPPLSVTESTLDTQPSPASS VSPARYPATSSVTLVDVVSALRPNTTPQPSNSSMTTRG FNYPWTSSGTDTKKSVSRIPSETYSSSPSGAGSTLHD NVFTSTARAFSEVPTTANGSTKTNHVHITGIVVNKPK DGMENLYFQGLEHHHHHHHHHHHGGSGGLPETGGD R	63
Иллюстративный домен 1 ¹ CD96 человека	VWEKTVNTEENVYATLGSDVNLTCQTQTVGFFVQ MQWSKVTNKIDLIAVYHPQYGFYCA YGRPCESLVT FTETPENGSKWTLHLRNMSCSVSGRYECMLVLYPE GIQTKIYNLLIQTHV	64
Иллюстративная C89S ¹ домена 1 CD96 человека	VWEKTVNTEENVYATLGSDVNLTCQTQTVGFFVQ MQWSKVTNKIDLIAVYHPQYGFYCA YGRPCESLVT FTETPENGSKWTLHLRNMSSSVSGRYECMLVLYPEG IQTKIYNLLIQTHV	65
Иллюстративная изоформа 1 ² внеклеточного домена CD96 яванского макака	VWGKPFNTEENIYATLGSDVNLTCQTQAKGFLVQM QWSKVTDKADLIALYHPQYGFHCA YGSPCESLVTFT QTPENGSKWTLHLRNMSSSVSGRYECMLTLYPEGM QTKIYNLLIQTHVTPDEWKS NHTIEIEINQTLEIPCFQ NSSSEISSEFTYAWLVVKNSSSTDSWVLLSKGKRYDN GTQQTLISQDHLISSSTLLKDRVKV GIDYRLHLSVPVQI FDDGRKF SCHIRVGPDKILRSSTTIKVF AKPEIPMIVE	66

	NNSTDV LVERTFTCLLKNVFPKANIWFIDGSFLHDE KEGIYITNEERKKGKDGFLLELKSVLTRVHSDKPAQSD NLTIWCMALSPVPGNKVWNISSEKITFLLGSEMSTTD LPPSVTESTLDTQPSPASSVSPTRYPATSSVTLADVSA LRPNTTPQSSSSSVTTQDFNYPWTSSGTD AKKSFSQI PSETYSSSPSGAGSTLHDNVFTSTTRALSEVPTTANG STKTNHVHITGIVVSKPKDGM	
Иллюстративная последовательность изоформы 2 ² внеклеточного домена CD96 яванского макака	VWGKPFNTEENIYATLGSDVNLTCQTQAKGFLVQM QWSKVTDKADLIALYHPQYGFHCAYGSPCESLVTFT QTPENGSKWTLHLRNMSSSVSGRYECMLTLYPEGM QTKIYNLLIQTHVTPDEWKSNTIEIEINQTL EIPCFQ NSSSEISSEFTYAWLVEDNGTQQTLISQDHLISSSTLL KDRVKVGIDYRLHLSPVQIFDDGRKF SCHIRVGPDKI LRSSTTIKVFAPKPEIPMIVENNSTDV LVERTFTCLLKN VFPKANIWFIDGSFLHDEKEGIYITNEERKKGKDGFL E LKSVLTRVHSDKPAQSDNLTIWCMALSPVPGNKVW NISSEKITFLLGSEMSTTDLPPSVTESTLDTQPSPASSV SPTRYPATSSVTLADV SALRPNTTPQSSSSSVTTQDF NYPWTSSGTD AKKSFSQIPSETYSSSPSGAGSTLHDN VFTSTTRALSEVPTTANGSTKTNHVHITGIVVSKPKD GMENLYFQGLEHHHHHHHHHHHGGSGGLPETGGDR	111
Иллюстративный домен 1 ² CD96 яванского макака	VWGKPFNTEENIYATLGSDVNLTCQTQAKGFLVQM QWSKVTDKADLIALYHPQYGFHCAYGSPCESLVTFT QTPENGSKWTLHLRNMSSSVSGRYECMLTLYPEGM QTKIYNLLIQTHV	112

¹ Домены обозначены на основании описания доменов в UniProt для hCD96.

² В случае гомологии последовательности суCD96 между последовательностью hCD96 и последовательностью суCD96 ее использовали для определения домена 1, домена 2 или домена 3.

Таблица 4. Иллюстративные последовательности TIGIT.

Описание	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
Иллюстративный внеклеточный домен TIGIT человека	MMTGTIETTGNISA EKGGS IILQCHLSSTTAQVTQVN WEQQDQLLAICNADLGWHISPSFKDRVAPGPGLGLT LQSLTVNDTGEYFCIYHTYDPDGTYTGRIFLEVLESSV	113

	AENGARFQENLYFQGLENNNNNNNNNNHGGSGGLPE TGGDR	
Иллюстративный внеклеточный домен TIGIT яванского макака	MMTGTIETTGNISAKKGGSVILQCHLSSTMAQVTQV NWEQHDHSLLAIRNAELGWHIYPAFKDRVAPGPG GLTLQSLTMNDTGEYFCTYHTYPDGTYRGRIFLEVL ESSVAEHSARFQENLYFQGLENNNNNNNNNNHGGSG GLPETGGDR	114

[00151] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96, при этом первая антигенсвязывающая область содержит VH, содержащую одну, две или все три CDR из VH, представленной в таблице 1. В определенных вариантах осуществления первая антигенсвязывающая область содержит CDRH1 из VH, представленной в таблице 1. В определенных вариантах осуществления первая антигенсвязывающая область содержит CDRH2 из VH, представленной в таблице 1. В определенных вариантах осуществления первая антигенсвязывающая область содержит CDRH3 из VH, представленной в таблице 1.

[00152] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96, при этом первая антигенсвязывающая область содержит VL, содержащую одну, две или все три CDR из VL, раскрытой в таблице 1. В определенных вариантах осуществления первая антигенсвязывающая область содержит CDRL1 из VL, представленной в таблице 1. В определенных вариантах осуществления первая антигенсвязывающая область содержит CDRL2 из VL, представленной в таблице 1. В определенных вариантах осуществления первая антигенсвязывающая область содержит CDRL3 из VL, представленной в таблице 1.

[00153] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT, и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), при этом вторая антигенсвязывающая область содержит VH, содержащую одну, две или все три CDR из VH, представленной в таблице 2. В определенных вариантах осуществления вторая антигенсвязывающая область содержит CDRH1 из VH, представленной в таблице 2. В определенных вариантах осуществления вторая антигенсвязывающая область содержит CDRH2 из VH, представленной в таблице 2. В определенных вариантах осуществления вторая

антигенсвязывающая область содержит CDRH3 из VH, представленной в таблице 2.

[00154] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT, и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), при этом вторая антигенсвязывающая область содержит VL, содержащую одну, две или все три CDR из VL, представленной в таблице 2. В определенных вариантах осуществления вторая антигенсвязывающая область содержит CDRH1 из VL, представленной в таблице 2. В определенных вариантах осуществления вторая антигенсвязывающая область содержит CDRH2 из VL, представленной в таблице 2. В определенных вариантах осуществления вторая антигенсвязывающая область содержит CDRH3 из VL, представленной в таблице 2.

[00155] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), при этом первая антигенсвязывающая область содержит VH, содержащую одну, две или все три CDR из VH, представленной в таблице 1, и вторая антигенсвязывающая область содержит VH, содержащую одну, две или все три CDR из VH, представленной в таблице 2. В определенных вариантах осуществления первая антигенсвязывающая область содержит CDRH1 из VH, представленной в таблице 1, и вторая антигенсвязывающая область содержит CDRH1 из VH, представленной в таблице 2. В определенных вариантах осуществления первая антигенсвязывающая область содержит CDRH2 из VH, представленной в таблице 1, и вторая антигенсвязывающая область содержит CDRH2 из VH, представленной в таблице 2. В определенных вариантах осуществления первая антигенсвязывающая область содержит CDRH3 из VH, представленной в таблице 1, и вторая антигенсвязывающая область содержит CDRH3 из VH, представленной в таблице 2.

[00156] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), при этом первая антигенсвязывающая область содержит VL, содержащую одну, две или все три CDR из VL, представленной в таблице 1, и вторая антигенсвязывающая область содержит VL, содержащую одну, две или все три CDR из VL, представленной в таблице 2. В определенных вариантах осуществления первая антигенсвязывающая область содержит CDRH1 из VL, представленной в таблице 1, и вторая антигенсвязывающая область содержит CDRH1 из VL, представленной в таблице 2. В определенных вариантах

осуществления первая антигенсвязывающая область содержит CDRH2 из VL, представленной в таблице 1, и вторая антигенсвязывающая область содержит CDRH2 из VL, представленной в таблице 2. В определенных вариантах осуществления первая антигенсвязывающая область содержит CDRH3 из VL, представленной в таблице 1, и вторая антигенсвязывающая область содержит CDRH3 из VL, представленной в таблице 2.

[00157] 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 2. В определенных вариантах осуществления антитело содержит CDRH1 домена VH, изложенную в таблице 2. В определенных вариантах осуществления антитело содержит CDRH2 домена VH, изложенную в таблице 2. В определенных вариантах осуществления антитело содержит CDRH3 домена VH, изложенную в таблице 2.

[00158] 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 2. В определенных вариантах осуществления антитело содержит CDRL1 домена VL, изложенную в таблице 2. В определенных вариантах осуществления антитело содержит CDRL2 домена VL, изложенную в таблице 2. В определенных вариантах осуществления антитело содержит CDRL3 домена VL, изложенную в таблице 2.

[00159] Отдельные CDR полиспецифической молекулы или антитела, раскрытых в данном документе, могут быть определены в соответствии с любой схемой нумерации CDR, известной из уровня техники.

[00160] В определенных вариантах осуществления одна или более CDR полиспецифической молекулы или антитела, раскрытых 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.

[00161] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены полиспецифические молекулы, содержащие первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96, где первая антигенсвязывающая область содержит CDR антигенсвязывающей области, раскрытой в таблице 1 в данном документе, как определено по схеме нумерации Kabat.

[00162] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены полиспецифические молекулы, содержащие первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT, и вторую

антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где вторая антигенсвязывающая область содержит CDR антигенсвязывающей области, раскрытой в таблице 2 в данном документе, как определено по схеме нумерации Kabat.

[00163] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены полиспецифические молекулы, содержащие первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит CDR антигенсвязывающей области, раскрытой в таблице 1 в данном документе, и вторая антигенсвязывающая область содержит CDR антигенсвязывающей области, раскрытой в таблице 2 в данном документе, как определено по схеме нумерации Kabat.

[00164] 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 2, как определено по схеме нумерации Kabat.

[00165] В определенных вариантах осуществления одна или более CDR полиспецифической молекулы или антитела, раскрытых 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).

[00166] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены полиспецифические молекулы, содержащие первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96, где первая антигенсвязывающая область содержит CDR антигенсвязывающей области, раскрытой в таблице 1 в данном документе, как определено по системе нумерации Chothia.

[00167] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены полиспецифические молекулы, содержащие первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT, и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где вторая антигенсвязывающая область содержит CDR антигенсвязывающей области, раскрытой в таблице 2 в данном документе, как определено по системе нумерации Chothia.

[00168] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении

предусмотрены полиспецифические молекулы, содержащие первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит CDR антигенсвязывающей области, раскрытой в таблице 1 в данном документе, и вторая антигенсвязывающая область содержит CDR антигенсвязывающей области, раскрытой в таблице 2 в данном документе, как определено по системе нумерации Chothia.

[00169] 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, раскрытого в таблице 2 в данном документе, как определено по системе нумерации Chothia.

[00170] В определенных вариантах осуществления одна или более CDR полиспецифической молекулы или антитела, раскрытых 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.

[00171] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены полиспецифические молекулы, содержащие первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96, где первая антигенсвязывающая область содержит CDR антигенсвязывающей области, раскрытой в таблице 1 в данном документе, как определено по системе нумерации MacCallum.

[00172] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены полиспецифические молекулы, содержащие первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT, и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где вторая антигенсвязывающая область содержит CDR антигенсвязывающей области, раскрытой в таблице 2 в данном документе, как определено по системе нумерации MacCallum.

[00173] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены полиспецифические молекулы, содержащие первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит CDR антигенсвязывающей области, раскрытой в

таблице 1 в данном документе, и вторая антигенсвязывающая область содержит CDR антигенсвязывающей области, раскрытой в таблице 2 в данном документе, как определено по системе нумерации MacCallum.

[00174] 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 2, как определено по системе нумерации MacCallum.

[00175] В определенных вариантах осуществления CDR полиспецифической молекулы или антитела, раскрытых 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.

[00176] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены полиспецифические молекулы, содержащие первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96, где первая антигенсвязывающая область содержит CDR антигенсвязывающей области, раскрытой в таблице 1 в данном документе, как определено по системе нумерации IMGT.

[00177] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены полиспецифические молекулы, содержащие первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT, и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где вторая антигенсвязывающая область содержит CDR антигенсвязывающей области, раскрытой в таблице 2 в данном документе, как определено по системе нумерации IMGT.

[00178] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены полиспецифические молекулы, содержащие первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит CDR антигенсвязывающей области, раскрытой в таблице 1 в данном документе, и вторая антигенсвязывающая область содержит CDR антигенсвязывающей области, раскрытой в таблице 2 в данном документе, как определено по системе нумерации IMGT.

[00179] 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 2, как определено по системе нумерации IMGT.

[00180] В определенных вариантах осуществления CDR полиспецифической молекулы или антитела, раскрытых 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 в программном обеспечении для моделирования антител AbM от Oxford Molecular (Oxford Molecular Group, Inc.), включенном в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00181] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены полиспецифические молекулы, содержащие первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96, где первая антигенсвязывающая область содержит CDR антигенсвязывающей области, раскрытой в таблице 1 в данном документе, как определено по схеме нумерации AbM.

[00182] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены полиспецифические молекулы, содержащие первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT, и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где вторая антигенсвязывающая область содержит CDR антигенсвязывающей области, раскрытой в таблице 2 в данном документе, как определено по схеме нумерации AbM.

[00183] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены полиспецифические молекулы, содержащие первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит CDR антигенсвязывающей области, раскрытой в таблице 1 в данном документе, и вторая антигенсвязывающая область содержит CDR антигенсвязывающей области, раскрытой в таблице 2 в данном документе, как определено по схеме нумерации AbM.

[00184] 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 2, как определено по схеме нумерации AbM.

[00185] В определенных вариантах осуществления CDR антитела, раскрытого в данном документе, могут быть определены в соответствии с системой нумерации АНо, как описано в Honegger and Plückthun, *J. Mol. Biol.* 309:657-670 (2001), включенной в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00186] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены полиспецифические молекулы, содержащие первую антигенсвязывающую

область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96, где первая антигенсвязывающая область содержит CDR антигенсвязывающей области, раскрытой в таблице 1 в данном документе, как определено по системе нумерации АНо.

[00187] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены полиспецифические молекулы, содержащие первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT, и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где вторая антигенсвязывающая область содержит CDR антигенсвязывающей области, раскрытой в таблице 2 в данном документе, как определено по системе нумерации АНо.

[00188] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены полиспецифические молекулы, содержащие первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит CDR антигенсвязывающей области, раскрытой в таблице 1 в данном документе, и вторая антигенсвязывающая область содержит CDR антигенсвязывающей области, раскрытой в таблице 2 в данном документе, как определено по системе нумерации АНо.

[00189] 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 2, как определено по системе нумерации АНо.

[00190] В определенных вариантах осуществления каждая из отдельных CDR полиспецифической молекулы или антитела, раскрытого в данном документе, определена независимо в соответствии с одной из схем нумерации по Kabat, Chothia, MacCallum, IMGT, АНо или AbM или посредством структурного анализа полиспецифической молекулы, где структурный анализ идентифицирует остатки в вариабельной области(областях), которые, согласно предположениям, вступают в контакт с эпитопной областью CD96 или TIGIT.

[00191] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96, где первая антигенсвязывающая область содержит VH, содержащую аминокислотные последовательности областей CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из VH, представленной под SEQ ID NO: 34, 36 или 38, и VL, содержащую аминокислотные последовательности областей CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из

VL, представленной под SEQ ID NO: 35, 37 или 39, где каждая CDR определена независимо в соответствии с одной из схем нумерации по Kabat, Chothia, MacCallum, IMGT, АНо или AbM или посредством структурного анализа полиспецифической молекулы, где структурный анализ идентифицирует остатки в варибельной области(областях), которые, согласно предположениям, вступают в контакт с эпитопной областью CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака).

[00192] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT, и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где вторая антигенсвязывающая область содержит VH, содержащую аминокислотные последовательности областей CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из VH, представленной под SEQ ID NO: 40, и VL, содержащую аминокислотные последовательности областей CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из VL, представленной под SEQ ID NO: 41, где каждая CDR определена независимо в соответствии с одной из схем нумерации по Kabat, Chothia, MacCallum, IMGT, АНо или AbM или посредством структурного анализа полиспецифической молекулы, где структурный анализ идентифицирует остатки в варибельной области(областях), которые, согласно предположениям, вступают в контакт с эпитопной областью TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака).

[00193] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит VH, содержащую аминокислотные последовательности областей CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из VH, представленной под SEQ ID NO: 34, 36 или 38, и VL, содержащую аминокислотные последовательности областей CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из VL, представленной под SEQ ID NO: 35, 37 или 39, и вторая антигенсвязывающая область содержит VH, содержащую аминокислотные последовательности областей CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из VH, представленной под SEQ ID NO: 40, и VL, содержащую аминокислотные последовательности областей CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из VL, представленной под SEQ ID NO: 41, где каждая CDR определена независимо в соответствии с одной из схем нумерации по Kabat, Chothia, MacCallum, IMGT, АНо или AbM или посредством структурного анализа полиспецифической молекулы, где структурный анализ идентифицирует остатки в варибельной области(областях), которые, согласно предположениям, вступают в контакт с эпитопной областью CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) соответственно.

[00194] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении

предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96, где первая антигенсвязывающая область содержит VH, содержащую аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3, представленные под SEQ ID NO: 10, 11 и 12; 16, 17 и 18 или 22, 23 и 24 соответственно.

[00195] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96, где первая антигенсвязывающая область содержит VL, содержащую аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3, представленные под SEQ ID NO: 13, 14 и 15; 19, 20 и 21 или 25, 26 и 27 соответственно.

[00196] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96, где первая антигенсвязывающая область 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, представленные под SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13, 14 и 15; 16, 17, 18, 19, 20 и 21 или 22, 23, 24, 25, 26 и 27 соответственно.

[00197] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96, где первая антигенсвязывающая область содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% (например, по меньшей мере 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентичной аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 34, 36 или 38. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96, где первая антигенсвязывающая область содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 34, 36 или 38. В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность VH состоит

из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34, 36 и 38.

[00198] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96, где первая антигенсвязывающая область содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% (например, по меньшей мере 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентичной аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 35, 37 или 39. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96, где первая антигенсвязывающая область содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 35, 37 или 39. В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность VL состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 35, 37 и 39.

[00199] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96, где первая антигенсвязывающая область содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% (например, по меньшей мере 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентичной аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 34, 36 или 38, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% (например, по меньшей мере 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентичной аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 35, 37 или 39. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96, где первая антигенсвязывающая область содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34, и VL, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 35. В определенных вариантах осуществления

аминокислотная последовательность VH состоит из аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 34, и аминокислотная последовательность VL состоит из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 35. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96, где первая антигенсвязывающая область содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 36, и VL, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 37. В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность VH состоит из аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 36, и аминокислотная последовательность VL состоит из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 37. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96, где первая антигенсвязывающая область содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 38, и VL, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 39. В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность VH состоит из аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 38, и аминокислотная последовательность VL состоит из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 39.

[00200] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96, где первая антигенсвязывающая область содержит аминокислотные последовательности VH и VL, представленные под SEQ ID NO: 34 и 35; 36 и 37 или 38 и 39 соответственно. В определенных вариантах осуществления аминокислотные последовательности VH и VL состоят из аминокислотных последовательностей, выбранных из групп, состоящих из SEQ ID NO: 34 и 35; 36 и 37 и 38 и 39 соответственно.

[00201] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, которая перекрестно конкурирует за связывание с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) с полиспецифической молекулой, содержащей аминокислотные последовательности VH и VL, представленные под SEQ ID NO: 34 и 35; 36 и 37 или 38 и 39 соответственно.

[00202] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении

предусмотрена полиспецифическая молекула, которая связывается с тем же или перекрывающимся эпитопом CD96 (например, эпитопом CD96 человека или эпитопом CD96 яванского макака), что и полиспецифическая молекула, описанная в данном документе, например, полиспецифическая молекула, содержащая аминокислотные последовательности VH и VL, представленные под SEQ ID NO: 34 и 35; 36 и 37 или 38 и 39 соответственно.

[00203] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT, и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где вторая антигенсвязывающая область содержит VH, содержащую аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3, представленные под SEQ ID NO: 28, 29 и 30 соответственно.

[00204] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT, и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где вторая антигенсвязывающая область содержит VL, содержащую аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3, представленные под SEQ ID NO: 31, 32 и 33 соответственно.

[00205] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT, и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где вторая антигенсвязывающая область 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, представленные под SEQ ID NO: 28, 29, 30, 31, 32 и 33 соответственно.

[00206] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT, и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где вторая антигенсвязывающая область содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% (например, по меньшей мере 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентичной аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 40. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с

антигеном, отличным от TIGIT, и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где вторая антигенсвязывающая область содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 40. В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность VH состоит из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 40.

[00207] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT, и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где вторая антигенсвязывающая область содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% (например, по меньшей мере 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентичной аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 41. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT, и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где вторая антигенсвязывающая область содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 41. В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность VL состоит из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 41.

[00208] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT, и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где вторая антигенсвязывающая область содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% (например, по меньшей мере 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентичной аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 40, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% (например, по меньшей мере 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентичной аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 41. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT, и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где вторая антигенсвязывающая область

содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 40, и VL, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 41. В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность VH состоит из аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 40, и аминокислотная последовательность VL состоит из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 41.

[00209] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT, и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где вторая антигенсвязывающая область содержит аминокислотные последовательности VH и VL, представленные под SEQ ID NO: 40 и 41 соответственно. В определенных вариантах осуществления аминокислотные последовательности VH и VL состоят из аминокислотных последовательностей, представленных под SEQ ID NO: 40 и 41 соответственно.

[00210] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, которая перекрестно конкурирует за связывание с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) с полиспецифической молекулой, содержащей аминокислотные последовательности VH и VL, представленные под SEQ ID NO: 40 и 41 соответственно.

[00211] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, которая связывается с тем же или перекрывающимся эпитопом TIGIT (например, эпитопом TIGIT человека или эпитопом TIGIT яванского макака), что и полиспецифическая молекула, описанная в данном документе, например, полиспецифическая молекула, содержащая аминокислотные последовательности VH и VL, представленные под SEQ ID NO: 40 и 41 соответственно.

[00212] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая молекула содержит первую VH, содержащую аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3, представленные под SEQ ID NO: 10, 11 и 12; 16, 17 и 18 или 22, 23 и 24 соответственно, и вторая антигенсвязывающая область содержит вторую VH, содержащую аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3, представленные под SEQ ID NO: 28, 29 и 30 соответственно.

[00213] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически

связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая молекула содержит первую VL, содержащую аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3, представленные под SEQ ID NO: 13, 14 и 15; 19, 20 и 21 или 25, 26 и 27 соответственно, и вторая антигенсвязывающая область содержит вторую VL, содержащую аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3, представленные под SEQ ID NO: 31, 32 и 33 соответственно.

[00214] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая молекула содержит первую VH, содержащую области CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и первую VL, содержащую области CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где области CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13, 14 и 15; 16, 17, 18, 19, 20 и 21 или 22, 23, 24, 25, 26 и 27 соответственно, и вторая антигенсвязывающая область содержит вторую VH, содержащую области CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и вторую VL, содержащую области CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где области CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 28, 29, 30, 31, 32 и 33 соответственно.

[00215] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит первую VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% (например, по меньшей мере 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентичной аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 34, 36 или 38, и вторая антигенсвязывающая область содержит вторую VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% (например, по меньшей мере 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентичной аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 40. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит первую VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 34, 36 или 38, и вторая

антигенсвязывающая область содержит вторую VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 40. В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность первой VH состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34, 36 и 38, и аминокислотная последовательность второй VH состоит из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 40.

[00216] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит первую VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% (например, по меньшей мере 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентичной аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 35, 37 или 39, и вторая антигенсвязывающая область содержит вторую VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% (например, по меньшей мере 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентичной аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 41. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит первую VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 35, 37 или 39, и вторая антигенсвязывающая область содержит вторую VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 41. В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность первой VL состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 35, 37 и 39, и аминокислотная последовательность второй VL состоит из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 41.

[00217] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит первую VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% (например, по меньшей мере 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%)

идентичной аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 34, 36 или 38, и первую VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% (например, по меньшей мере 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентичной аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 35, 37 или 39, и вторая антигенсвязывающая область содержит вторую VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% (например, по меньшей мере 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентичной аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 40, и вторую VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% (например, по меньшей мере 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентичной аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 41. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит первую VH, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34, 36 или 38, и первую VL, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 35, 37 или 39, при этом вторая антигенсвязывающая область содержит вторую VH, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 40, и вторую VL, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 41. В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность первой VH состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34, 36 и 38, и аминокислотная последовательность первой VL состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 35, 37 и 39, и аминокислотная последовательность второй VH состоит из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 40, и аминокислотная последовательность второй VL состоит из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 41.

[00218] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит первую VH и первую VL, содержащие аминокислотные последовательности, представленные под SEQ ID NO: 34 и 35; 36 и 37 или 38 и 39 соответственно, и вторая антигенсвязывающая область содержит вторую VH и вторую VL, содержащие аминокислотные последовательности, представленные под SEQ

ID NO: 40 и 41 соответственно. В определенных вариантах осуществления аминокислотные последовательности первой VH и первой VL состоят из аминокислотных последовательностей, выбранных из групп, состоящих из SEQ ID NO: 34 и 35; 36 и 37; и 38 и 39 соответственно, и аминокислотные последовательности второй VH и второй VL состоят из аминокислотных последовательностей, представленных под SEQ ID NO: 40 и 41 соответственно.

[00219] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая перекрестно конкурирует за связывание с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) с полиспецифической молекулой, содержащей аминокислотные последовательности VH и VL, представленные под SEQ ID NO: 34 и 35; 36 и 37 или 38 и 39 соответственно, и вторую антигенсвязывающую область, которая перекрестно конкурирует за связывание с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) с полиспецифической молекулой, содержащей аминокислотные последовательности VH и VL, представленные под SEQ ID NO: 40 и 41 соответственно.

[00220] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, которая содержит первую антигенсвязывающую область, которая связывается с тем же или перекрывающимся эпитопом CD96 (например, эпитопом CD96 человека или эпитопом CD96 яванского макака), что и полиспецифическая молекула, описанная в данном документе, например, полиспецифическая молекула, содержащая аминокислотные последовательности VH и VL, представленные под SEQ ID NO: 34 и 35; 36 и 37 или 38 и 39 соответственно, и вторую антигенсвязывающую область, которая связывается с тем же или перекрывающимся эпитопом TIGIT (например, эпитопом TIGIT человека или эпитопом TIGIT яванского макака), что и полиспецифическая молекула, описанная в данном документе, например, полиспецифическая молекула, содержащая аминокислотные последовательности VH и VL, представленные под SEQ ID NO: 40 и 41 соответственно.

[00221] 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: 28, 29 и 30 соответственно.

[00222] 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: 31, 32 и 33 соответственно.

[00223] 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: 28, 29, 30, 31, 32 и 33 соответственно.

[00224] 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 является 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%) идентичной аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 40. 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, представленную под SEQ ID NO: 40. В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность VH состоит из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 40.

[00225] 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 является 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%) идентичной аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 41. 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, представленную под SEQ ID NO: 41. В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность VL состоит из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 41.

[00226] 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 является на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% (например, по меньшей мере 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентичной аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 40, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% (например, по меньшей мере 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентичной аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 41. 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: 40, и VL, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 41. В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность VH состоит из аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 40, и аминокислотная последовательность VL состоит из аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 41.

[00227] 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, представленные под SEQ ID NO: 40 и 41 соответственно. В определенных вариантах осуществления аминокислотные последовательности VH и VL состоят из аминокислотных последовательностей, представленных под SEQ ID NO: 40 и 41 соответственно.

[00228] 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, представленные под SEQ ID NO: 40 и 41 соответственно.

[00229] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое связывается с тем же или перекрывающимся эпитопом TIGIT (например, эпитопом TIGIT человека или эпитопом TIGIT яванского макака), что и антитело, описанное в данном документе, например, антитело, содержащее аминокислотные последовательности VH и VL, представленные под SEQ ID NO: 40 и 41 соответственно.

[00230] В определенных вариантах осуществления эпитоп полиспецифической молекулы или антитела можно определить, например, посредством ЯМР-спектроскопии, поверхностного плазмонного резонанса (BIAcore[®]), рентген-дифракционных кристаллографических исследований, ELISA-анализов, водородно-дейтериевого обмена в сочетании с масс-спектрометрией (например, жидкостной хроматографией и масс-спектрометрией с электрораспылением), анализов сканирования олигопептидов на основе микрочипов и/или картирования посредством мутагенеза (например, картирования посредством сайт-направленного мутагенеза). В случае рентгеновской кристаллографии кристаллизацию можно осуществлять с применением любого из способов, известных из уровня 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, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Кристаллы полиспецифической молекулы:антиген или 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.*; заявку 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 посредством 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 полиспецифической молекулы или антитела определяют с применением исследований методом аланин-сканирующего мутагенеза. Кроме того, полиспецифические молекулы или антитела, которые распознают и связываются с теми же или перекрывающимися эпитопами CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), можно идентифицировать с применением стандартных методик, таких как иммуноанализ, например, при проявлении способности одной полиспецифической молекулы или антитела блокировать связывание другой полиспецифической молекулы или антитела с целевым антигеном, *т. е.* анализ конкурентного связывания. Анализы конкурентного связывания также можно применять для определения того, обладают ли две полиспецифические молекулы или антитела сходной специфичностью связывания в отношении эпитопа. Конкурентное связывание можно определить в анализе, в котором тестируемый иммуноглобулин ингибирует специфическое связывание эталонной полиспецифической молекулы или антитела с общим антигеном, таким как CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или 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. Stahli 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 применением 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, CD96, такого как CD96 человека или CD96 яванского макака, или 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. Конкуренентное 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 конкурирующие полиспецифическая молекула или антитело присутствуют в избытке, они будут ингибировать специфическое связывание эталонных полиспецифической молекулы или антитела с общим антигеном на по меньшей мере 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75% или больше. Анализ конкурентного связывания можно выполнять в большом количестве различных форматов с применением либо меченого антигена, либо меченых полиспецифической молекулы или антитела. В обычной версии этого анализа антиген иммобилизуют на 96-луночном планшете. Способность немеченых полиспецифической молекулы или 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, eds. Harlow E & Lane D *выше*, pp. 386-389, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00231] В определенных вариантах осуществления полиспецифическая молекула ингибирует связывание CD96 человека с CD155 человека (также известным как рецептор полиовируса (PVR)). В определенных вариантах осуществления связывание CD96 человека с CD155 человека снижено на более чем 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% в присутствии полиспецифической молекулы относительно связывания CD96 человека с CD155 человека в отсутствие полиспецифической молекулы.

[00232] В определенных вариантах осуществления полиспецифическая молекула ингибирует связывание растворимого фрагмента CD96 человека с растворимым фрагментом CD155 человека. В определенных вариантах осуществления связывание растворимого фрагмента CD96 человека с растворимым фрагментом CD155 человека снижено на более чем 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% в присутствии полиспецифической молекулы относительно связывания растворимого фрагмента CD96 человека с растворимым фрагментом CD155 человека в отсутствие полиспецифической молекулы.

[00233] В определенных вариантах осуществления антитело ингибирует связывание CD96-экспрессирующей клетки с растворимым фрагментом CD155 человека. В определенных вариантах осуществления связывание CD96-экспрессирующей клетки с растворимым фрагментом CD155 человека снижено на более чем 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% в присутствии полиспецифической молекулы относительно связывания CD96-экспрессирующей клетки с растворимым фрагментом CD155 человека в отсутствие полиспецифической молекулы.

[00234] В определенных вариантах осуществления полиспецифическая молекула ингибирует связывание CD96-экспрессирующей клетки с клеткой, экспрессирующей CD155 человека. В определенных вариантах осуществления связывание CD96-экспрессирующей клетки с CD155-экспрессирующей клеткой снижено на более чем 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% в присутствии полиспецифической молекулы относительно связывания CD96-экспрессирующей клетки с CD155-экспрессирующей клеткой в отсутствие полиспецифической молекулы.

[00235] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96, при этом первая антигенсвязывающая область содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 1, 3, 5 или 67-99. В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность тяжелой цепи состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 3, 5 и 67-99.

[00236] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96, при этом первая антигенсвязывающая область содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 2, 4 или 6. В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность легкой цепи состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 4 и 6.

[00237] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96, при этом первая антигенсвязывающая область содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая цепь и легкая цепь содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 1 и 2; 3 и 4 или 5 и 6 соответственно. В определенных вариантах осуществления аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи состоят из аминокислотных последовательностей, выбранных из групп, состоящих из SEQ ID NO: 1 и 2; 3 и 4; и 5 и 6 соответственно.

[00238] В определенных вариантах осуществления полиспецифическая молекула ингибирует связывание TIGIT человека с CD155 человека (также известным как рецептор полиовируса (PVR)). В определенных вариантах осуществления связывание TIGIT

человека с CD155 человека снижено на более чем 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% в присутствии полиспецифической молекулы относительно связывания TIGIT человека с CD155 человека в отсутствие полиспецифической молекулы.

[00239] В определенных вариантах осуществления полиспецифическая молекула 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 снижено на более чем 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% в присутствии полиспецифической молекулы относительно связывания растворимого фрагмента TIGIT человека с растворимым фрагментом CD155 человека в отсутствие полиспецифической молекулы.

[00240] В определенных вариантах осуществления полиспецифическая молекула ингибирует связывание TIGIT-экспрессирующей клетки с растворимым фрагментом CD155 человека. В определенных вариантах осуществления связывание TIGIT-экспрессирующей клетки с растворимым фрагментом CD155 человека снижено на более чем 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% в присутствии полиспецифической молекулы относительно связывания TIGIT-экспрессирующей клетки с растворимым фрагментом CD155 человека в отсутствие полиспецифической молекулы.

[00241] В определенных вариантах осуществления полиспецифическая молекула ингибирует связывание TIGIT-экспрессирующей клетки с клеткой, экспрессирующей CD155 человека. В определенных вариантах осуществления связывание TIGIT-экспрессирующей клетки с CD155-экспрессирующей клеткой снижено на более чем 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% в присутствии полиспецифической молекулы относительно связывания TIGIT-экспрессирующей клетки с CD155-экспрессирующей клеткой в отсутствие полиспецифической молекулы.

[00242] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT, и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), при этом вторая антигенсвязывающая область содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 7 или 100-110. В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность тяжелой цепи состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7 и 100-110.

[00243] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывает антиген, отличный от TIGIT, и вторую

антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), при этом вторая антигенсвязывающая область содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 8 или 9. В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность легкой цепи состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8 и 9.

[00244] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT, и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), при этом вторая антигенсвязывающая область содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая цепь и легкая цепь содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 7 и 8 или 7 и 9 соответственно. В определенных вариантах осуществления аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи состоят из аминокислотных последовательностей, выбранных из групп, состоящих из SEQ ID NO: 7 и 8; и 7 и 9 соответственно.

[00245] В определенных вариантах осуществления полиспецифическая молекула ингибирует связывание CD96 человека и TIGIT человека с CD155 человека (также известным как рецептор полиовируса (PVR)). В определенных вариантах осуществления связывание CD96 человека и TIGIT человека с CD155 человека снижено на более чем 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% в присутствии полиспецифической молекулы относительно связывания CD96 человека и TIGIT человека с CD155 человека в отсутствие полиспецифической молекулы.

[00246] В определенных вариантах осуществления полиспецифическая молекула ингибирует связывание растворимого фрагмента CD96 человека и растворимого фрагмента TIGIT человека с растворимым фрагментом CD155 человека. В определенных вариантах осуществления связывание растворимого фрагмента CD96 человека и растворимого фрагмента TIGIT человека с растворимым фрагментом CD155 человека снижено на более чем 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% в присутствии полиспецифической молекулы относительно связывания растворимого фрагмента CD96 человека и растворимого фрагмента TIGIT человека с растворимым фрагментом CD155 человека в отсутствие полиспецифической молекулы.

[00247] В определенных вариантах осуществления полиспецифическая молекула ингибирует связывание клетки, экспрессирующей CD96, TIGIT или CD96 и TIGIT, с растворимым фрагментом CD155 человека. В определенных вариантах осуществления связывание клетки, экспрессирующей CD96, TIGIT или CD96 и TIGIT, с растворимым фрагментом CD155 человека снижено на более чем 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% в присутствии полиспецифической молекулы относительно связывания клетки, экспрессирующей CD96, TIGIT или CD96 и TIGIT, с растворимым фрагментом CD155 человека в отсутствие полиспецифической молекулы.

[00248] В определенных вариантах осуществления полиспецифическая молекула ингибирует связывание клетки, экспрессирующей CD96, TIGIT или CD96 и TIGIT, с клеткой, экспрессирующей CD155 человека. В определенных вариантах осуществления связывание клетки, экспрессирующей CD96, TIGIT или CD96 и TIGIT, с CD155-экспрессирующей клеткой снижено на более чем 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% в присутствии полиспецифической молекулы относительно связывания клетки, экспрессирующей CD96, TIGIT или CD96 и TIGIT, с CD155-экспрессирующей клеткой в отсутствие полиспецифической молекулы.

[00249] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), при этом первая антигенсвязывающая область содержит первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 1, 2, 3 или 67-99, и вторую антигенсвязывающую область, содержащую вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 7 или 100-110. В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность первой тяжелой цепи состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 2, 3 и 67-99, и аминокислотная последовательность второй тяжелой цепи состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7 и 100-110.

[00250] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), при этом первая антигенсвязывающая область содержит первую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 2, 4 или 6, и вторая антигенсвязывающая область содержит вторую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID: 8 или 9. В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность первой легкой цепи состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 4 и 6, и аминокислотная последовательность второй легкой цепи состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8 и 9.

[00251] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически

связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), при этом первая антигенсвязывающая область содержит первую тяжелую цепь и первую легкую цепь, где первая тяжелая цепь и первая легкая цепь содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 1 и 2; 3 и 4 или 5 и 6 соответственно, и вторая антигенсвязывающая область содержит вторую тяжелую цепь и вторую легкую цепь, где вторая тяжелая цепь и вторая легкая цепь содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 7 и 8 или 7 и 9 соответственно. В определенных вариантах осуществления аминокислотные последовательности первой тяжелой цепи и первой легкой цепи состоят из аминокислотных последовательностей, выбранных из групп, состоящих из SEQ ID NO: 1 и 2; 3 и 4; и 5 и 6 соответственно, и аминокислотные последовательности второй тяжелой цепи и второй легкой цепи состоят из аминокислотных последовательностей, выбранных из групп, состоящих из SEQ ID NO: 7 и 8; и 7 и 9 соответственно.

[00252] 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 снижается 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.

[00253] 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 снижается 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.

[00254] 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 снижено 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 растворимым фрагментом CD155 человека в отсутствие антитела.

[00255] 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 снижено 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.

[00256] 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: 107, 108, 109 или 110. В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность тяжелой цепи состоит из аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 107, 108, 109 или 110.

[00257] 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, представленную под SEQ ID NO: 8 или 9. В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность легкой цепи состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8 и 9.

[00258] 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: 107 и 8; 107 и 9; 108 и 8; 108 и 9; 109 и 8; 109 и 9; 110 и 8 или 110 и 9 соответственно.

[00259] В определенных вариантах осуществления аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи состоят из аминокислотных последовательностей, выбранных из групп, состоящих из SEQ ID NO: 107 и 8; 107 и 9; 108 и 8; 108 и 9; 109 и 8; 109 и 9; 110 и 8 или 110 и 9 соответственно.

[00260] В определенных вариантах осуществления раскрытые в данном документе полиспецифическая молекула или антитело конъюгированы с цитотоксическим средством, цитостатическим средством, токсином, радионуклидом или выявляемой меткой. В определенных вариантах осуществления цитотоксическое средство способно индуцировать гибель или разрушение клетки при контакте с ней. В определенных вариантах осуществления цитостатическое средство способно предотвращать или существенно снижать пролиферацию и/или ингибировать активность или функционирование клетки при контакте с ней. 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 выявляемая метка содержит флуоресцентный фрагмент или концевую группу для клик-химии.

[00261] В полиспецифических молекулах или 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.

[00262] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96, при этом первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 49-60. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96, при этом первая антигенсвязывающая область содержит константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 42.

[00263] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT, и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), при этом вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 49-60. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT, и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), при этом первая антигенсвязывающая область содержит константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 43 или 44.

[00264] В определенных вариантах осуществления полиспецифическая молекула содержит первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), при этом первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 50, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 56. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении

предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), при этом первая антигенсвязывающая область содержит константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 42, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 43 или 44.

[00265] 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: 57, 58, 59 или 60. 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: 43 или 44.

[00266] В определенных вариантах осуществления одна, две или более мутаций (например, аминокислотных замен) 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) описанных в данном документе полиспецифической молекулы или антитела для изменения одного или более функциональных свойств полиспецифической молекулы или антитела, таких как период полужизни в сыворотке крови, фиксация комплемента, связывание Fc-рецептора и/или антигензависимая клеточная цитотоксичность.

[00267] В определенных вариантах осуществления одна, две или более мутаций (например, аминокислотных замен) введены в шарнирную область описанных в данном документе полиспецифической молекулы или антитела, так что количество остатков цистеина 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. Количество остатков цистеина в шарнирной области может быть изменено, например, для облегчения сборки легкой и тяжелой цепей или для изменения (например, повышения или снижения) стабильности полиспецифической молекулы или антитела.

[00268] 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 полиспецифической молекулы или антитела *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, уменьшать или увеличивать) период полужизни полиспецифической молекулы или антитела *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 полиспецифической молекулы или антитела *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 полиспецифической молекулы или антитела *in vivo*. В конкретном варианте осуществления полиспецифические молекулы или антитела могут содержать 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 описанных в данном документе полиспецифической молекулы или 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 тех же полиспецифической молекулы или 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 полиспецифическая молекула или антитело содержат 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.

[00269] В определенных вариантах осуществления одна, две или более мутаций (например, аминокислотных замен) 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) описанных в данном документе полиспецифической молекулы или антитела для повышения или снижения аффинности полиспецифической молекулы или антитела к Fc-рецептору (например, активированному Fc-рецептору) на поверхности эффекторной клетки.

Мутации в Fc-области полиспецифической молекулы или антитела, которые снижают или повышают аффинность полиспецифической молекулы или 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 полиспецифической молекулы или 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.

[00270] В определенных вариантах осуществления полиспецифическая молекула или антитело содержат константную область тяжелой цепи, которая является вариантом константной области тяжелой цепи дикого типа, где вариант константной области тяжелой цепи связывается с Fc γ RIIB с большей аффинностью, чем константная область тяжелой цепи дикого типа связывается с Fc γ RIIB. 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 Fc γ RIIB экспрессируется на клетке, выбранной из группы, состоящей из макрофагов, моноцитов, В-клеток, дендритных клеток, эндотелиальных клеток и активированных Т-клеток.

[00271] В дополнительном варианте осуществления одна, две или более аминокислотных замен введены в Fc-область константной области IgG для изменения эффекторной функции(функций) полиспецифической молекулы или 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 полиспецифическая молекула или антитело характеризуются измененной аффинностью в отношении эффекторного лиганда, но сохраняют антигенсвязывающую способность исходных полиспецифической молекулы или 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 снижать связывание циркулирующих в кровотоке полиспецифической молекулы или антитела с Fc-рецептором, тем самым повышая локализацию в опухоли. 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 константную область и тем самым повышают локализацию в опухоли. В определенных вариантах осуществления одну или более аминокислотных замен можно ввести в Fc-область описанных в данном документе полиспецифической молекулы или антитела для удаления потенциальных сайтов гликозилирования в Fc-области, что может снижать связывание Fc-рецептора (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 описанных в данном документе полиспецифической молекулы или 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.

[00272] В определенных вариантах осуществления в константной области описанных в данном документе полиспецифической молекулы или 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 описанных в данном документе полиспецифической молекулы или 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 описанных в данном документе полиспецифической молекулы или 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 описанных в данном документе полиспецифической молекулы или 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 описанных в данном документе полиспецифической молекулы или 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 описанных в данном документе полиспецифической молекулы или антитела можно создать мутацию, выбранную из группы, состоящей из S267E, L328F и их комбинации, которые пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU.

[00273] В конкретном варианте осуществления описанные в данном документе полиспецифическая молекула или антитело содержат константную область IgG₁ с аминокислотной заменой N297Q или N297A, пронумерованной в соответствии с системой нумерации EU. В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе полиспецифическая молекула или антитело содержат 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 описанные в данном документе полиспецифическая молекула или антитело содержат 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 описанные в данном документе полиспецифическая молекула или антитело содержат 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 описанных в данном документе полиспецифической молекулы или антитела в положениях, соответствующих положениям L234, L235 и D265 в тяжелой цепи IgG₁ человека, которые пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU, не представляют собой L, L и D соответственно. Этот 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.

[00274] В определенных вариантах осуществления одну или более аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 329, 331 и 322 в константной области описанных в данном документе полиспецифической молекулы или антитела, которые пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU, можно заменить на отличающийся аминокислотный остаток, вследствие чего полиспецифическая молекула или антитело характеризуются измененным связыванием 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 описанных в данном документе

полиспецифической молекулы или антитела, которые пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU, тем самым изменяя способность полиспецифической молекулы или антитела фиксировать комплемент. Этот 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 полиспецифической молекулы или антитела опосредовать антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC) и/или повышения аффинности антитела к Fcγ-рецептору Fc-область описанных в данном документе полиспецифической молекулы или антитела модифицируют путем осуществления мутации одной или более аминокислот (например, введения 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. Этот подход дополнительно описан в международной публикации № WO 00/42072, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00275] В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе полиспецифическая молекула или антитело содержат модифицированную константную область IgG₁, где модификация повышает способность полиспецифической молекулы или антитела опосредовать антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC). В определенных вариантах осуществления 0,1, 1 или 10 мкг/мл полиспецифической молекулы или антитела способны индуцировать клеточную гибель по меньшей мере 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55% или 60% CD96-экспрессирующих и/или TIGIT-экспрессирующих клеток в течение 1, 2 или 3 часов, как измерено посредством способов, описанных в данном документе и/или известных 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.

[00276] В определенных вариантах осуществления полиспецифическая молекула,

описанная в данном документе, содержит первую и вторую константные области тяжелой цепи, где первая константная область тяжелой цепи и вторая константная область тяжелой цепи содержат разные аминокислотные замены.

[00277] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96 (например, TIGIT, например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутацию S239D, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, которая не содержит мутации S239D, A330L и I332E.

[00278] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96 (например, TIGIT, например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D и I332E, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, которая не содержит мутации S239D, A330L и I332E.

[00279] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96 (например, TIGIT, например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, A330L и I332E, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, которая не содержит мутации S239D, A330L и I332E.

[00280] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96 (например, TIGIT, например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутацию S239D, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D и I332E.

[00281] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении

или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, A330L и I332E, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D и I332E.

[00286] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96 (например, TIGIT, например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, которая не содержит мутации S239D, A330L и I332E, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутацию S239D.

[00287] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96 (например, TIGIT, например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, которая не содержит мутации S239D, A330L и I332E, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D и I332E.

[00288] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96 (например, TIGIT, например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, которая не содержит мутации S239D, A330L и I332E, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, A330L и I332E.

[00289] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT (например, CD96, например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутацию S239D, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, которая не содержит мутации S239D, A330L и I332E.

антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D и I332E, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутацию S239D.

[00295] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT (например, CD96, например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D и I332E, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, A330L и I332E.

[00296] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT (например, CD96, например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, A330L и I332E, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутацию S239D.

[00297] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT (например, CD96, например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, A330L и I332E, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D и I332E.

[00298] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT (например, CD96, например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, которая не содержит мутации S239D, A330L и I332E, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область

тяжелой цепи, содержащую мутацию S239D.

[00299] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT (например, CD96, например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, которая не содержит мутации S239D, A330L и I332E, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D и I332E.

[00300] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT (например, CD96, например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, которая не содержит мутации S239D, A330L и I332E, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, A330L и I332E.

[00301] В определенных вариантах осуществления полиспецифическая молекула, которая связывается с CD96 и/или TIGIT, содержит мутации типа «выступы-во-впадины», где полиспецифическая молекула содержит мутацию T366W в «цепи с выступами» и мутации T366S, L368A, Y407V в «цепи с впадинами» и необязательно дополнительный межцепочечный дисульфидный мостик между доменами СН3, введенные посредством, *например*, введения мутации Y349C в «цепь с выступами» и мутации E356C или мутации S354C в «цепь с впадинами»; мутаций R409D, K370E в «цепь с выступами» и мутаций D399K, E357K в «цепь с впадинами»; мутаций R409D, K370E в «цепь с выступами» и мутаций D399K, E357K в «цепь с впадинами»; мутации T366W в «цепь с выступами» и мутаций T366S, L368A, Y407V в «цепь с впадинами»; мутаций R409D, K370E в «цепь с выступами» и мутаций D399K, E357K в «цепь с впадинами»; мутаций Y349C, T366W в одну из цепей и мутаций E356C, T366S, L368A, Y407V в противоположную цепь; мутаций Y349C, T366W в одну цепь и мутаций S354C, T366S, L368A, Y407V в противоположную цепь; мутаций Y349C, T366W в одну цепь и мутаций S354C, T366S, L368A, Y407V в противоположную цепь; и мутаций Y349C, T366W в одну цепь и мутаций S354C, T366S, L368A, Y407V в противоположную цепь (нумерация в соответствии с системой нумерации EU).

[00302] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически

связывается с антигеном, отличным от CD96 (например, TIGIT, например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутацию T366W, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации T366S, L368A и Y407V.

[00303] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96 (например, TIGIT, например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации T366S, L368A и Y407V, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутацию T366W.

[00304] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT (например, CD96, например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутацию T366W, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации T366S, L368A и Y407V.

[00305] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT (например, CD96, например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации T366S, L368A и Y407V, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутацию T366W.

[00306] В определенных вариантах осуществления полиспецифическая молекула, описанная в данном документе, содержит первую и вторую константные области тяжелой цепи, где первая константная область тяжелой цепи и вторая константная область тяжелой цепи содержат замены типа «выступы-во-впадины» и дополнительно содержат дополнительные аминокислотные замены, которые в первой антигенсвязывающей области и второй антигенсвязывающей области являются разными.

[00307] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую

область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96 (например, TIGIT, например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, T366S, L368A и Y407V, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутацию T366W, но не содержащую мутации S239D, A330L и I332E.

[00308] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96 (например, TIGIT, например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, I332E, T366S, L368A и Y407V, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутацию T366W, но не содержащую мутации S239D, A330L и I332E.

[00309] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96 (например, TIGIT, например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, A330L, I332E, T366S, L368A и Y407V, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутацию T366W, но не содержащую мутации S239D, A330L и I332E.

[00310] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96 (например, TIGIT, например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, T366S, L368A и Y407V, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, I332E и T366W.

[00311] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96 (например, TIGIT, например, TIGIT человека

или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, T366S, L368A и Y407V, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, A330L, I332E и T366W.

[00312] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96 (например, TIGIT, например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, I332E, T366S, L368A и Y407V, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D и T366W.

[00313] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96 (например, TIGIT, например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, I332E, T366S, L368A и Y407V, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, A330L, I332E и T366W.

[00314] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96 (например, TIGIT, например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, A330L, I332E, T366S, L368A и Y407V, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D и T366W.

[00315] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96 (например, TIGIT, например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, A330L, I332E, T366S, L368A и Y407V, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, I332E и T366W.

[00316] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96 (например, TIGIT, например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации T366S, L368A и Y407V, но не содержащую мутации S239D, A330L и I332E, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D и T366W.

[00317] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96 (например, TIGIT, например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации T366S, L368A и Y407V, но не содержащую мутации S239D, A330L и I332E, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, I332E и T366W.

[00318] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96 (например, TIGIT, например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации T366S, L368A и Y407V, но не содержащую мутации S239D, A330L и I332E, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, A330L, I332E и T366W.

[00319] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96 (например, TIGIT, например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D и T366W, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации T366S, L368A и Y407V, но не содержащую мутации S239D, A330L и I332E.

[00320] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую

область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96 (например, TIGIT, например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, I332E и T366W, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации T366S, L368A и Y407V, но не содержащую мутации S239D, A330L и I332E.

[00321] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96 (например, TIGIT, например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, A330L, I332E и T366W, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации T366S, L368A и Y407V, но не содержащую мутации S239D, A330L и I332E.

[00322] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96 (например, TIGIT, например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D и T366W, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, I332E, T366S, L368A и Y407V.

[00323] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96 (например, TIGIT, например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D и T366W, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, A330L, I332E, T366S, L368A и Y407V.

[00324] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически

связывается с антигеном, отличным от CD96 (например, TIGIT, например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, I332E и T366W, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, T366S, L368A и Y407V.

[00325] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96 (например, TIGIT, например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, I332E и T366W, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, A330L, I332E, T366S, L368A и Y407V.

[00326] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96 (например, TIGIT, например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, A330L, I332E и T366W, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, T366S, L368A и Y407V.

[00327] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96 (например, TIGIT, например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, A330L, I332E и T366W, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, I332E, T366S, L368A и Y407V.

[00328] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96 (например, TIGIT, например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутацию T366W, но не содержащую мутации S239D, A330L и I332E, и вторая антигенсвязывающая область содержит

константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, T366S, L368A и Y407V.

[00329] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96 (например, TIGIT, например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутацию T366W, но не содержащую мутации S239D, A330L и I332E, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, I332E, T366S, L368A и Y407V.

[00330] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96 (например, TIGIT, например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутацию T366W, но не содержащую мутации S239D, A330L и I332E, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, A330L, I332E, T366S, L368A и Y407V.

[00331] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT (например, CD96, например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, T366S, L368A и Y407V, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутацию T366W, но не содержащую мутации S239D, A330L и I332E.

[00332] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT (например, CD96, например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, I332E, T366S, L368A и Y407V, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутацию T366W, но не содержащую мутации S239D, A330L и

I332E.

[00333] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT (например, CD96, например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, A330L, I332E, T366S, L368A и Y407V, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутацию T366W, но не содержащую мутации S239D, A330L и I332E.

[00334] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT (например, CD96, например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, T366S, L368A и Y407V, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, I332E и T366W.

[00335] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT (например, CD96, например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, T366S, L368A и Y407V, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, A330L, I332E и T366W.

[00336] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT (например, CD96, например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, I332E, T366S, L368A и Y407V, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D и T366W.

[00337] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую

область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT (например, CD96, например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, I332E, T366S, L368A и Y407V, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, A330L, I332E и T366W.

[00338] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT (например, CD96, например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, A330L, I332E, T366S, L368A и Y407V, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D и T366W.

[00339] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT (например, CD96, например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, A330L, I332E, T366S, L368A и Y407V, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, I332E и T366W.

[00340] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT (например, CD9,6, например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации T366S, L368A и Y407V, но не содержащую мутации S239D, A330L и I332E, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D и T366W.

[00341] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT (например, CD96, например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например,

TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации T366S, L368A и Y407V, но не содержащую мутации S239D, A330L и I332E, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, I332E и T366W.

[00342] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT (например, CD96, например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации T366S, L368A и Y407V, но не содержащую мутации S239D, A330L и I332E, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, A330L, I332E и T366W.

[00343] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT (например, CD96, например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D и T366W, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации T366S, L368A и Y407V, но не содержащую мутации S239D, A330L и I332E.

[00344] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT (например, CD96, например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, I332E и T366W, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации T366S, L368A и Y407V, но не содержащую мутации S239D, A330L и I332E.

[00345] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT (например, CD96, например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например,

TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, A330L, I332E и T366W, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации T366S, L368A и Y407V, но не содержащую мутации S239D, A330L и I332E.

[00346] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT (например, CD96, например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D и T366W, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, I332E, T366S, L368A и Y407V.

[00347] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT (например, CD96, например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D и T366W, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, A330L, I332E, T366S, L368A и Y407V.

[00348] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT (например, CD96, например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, I332E и T366W, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, T366S, L368A и Y407V.

[00349] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT (например, CD96, например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, I332E и T366W, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой

цепи, содержащую мутации S239D, A330L, I332E, T366S, L368A и Y407V.

[00350] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT (например, CD96, например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, A330L, I332E и T366W, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, T366S, L368A и Y407V.

[00351] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT (например, CD96, например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, A330L, I332E и T366W, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, I332E, T366S, L368A и Y407V.

[00352] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT (например, CD96, например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутацию T366W, но не содержащую мутации S239D, A330L и I332E, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, T366S, L368A и Y407V.

[00353] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT (например, CD96, например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутацию T366W, но не содержащую мутации S239D, A330L и I332E, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, I332E, T366S, L368A и Y407V.

[00354] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении

предусмотрена полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT (например, CD96, например, CD96 человека или CD96 яванского макака), и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), где первая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутацию T366W, но не содержащую мутации S239D, A330L и I332E, и вторая антигенсвязывающая область содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации S239D, A330L, I332E, T366S, L368A и Y407V.

[00355] В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе полиспецифическая молекула или антитело содержат константную область антитела IgG₄ и серин при аминокислотном остатке 228 тяжелой цепи, который пронумерован в соответствии с системой нумерации EU, заменен на пролин.

[00356] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), при этом полиспецифическая молекула содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 49-60.

[00357] В определенных вариантах осуществления любую из мутаций или модификаций константной области, описанных в данном документе, можно вводить в одну или обе константные области тяжелой цепи полиспецифической молекулы или антитела, описанных в данном документе, содержащих две константные области тяжелой цепи.

[00358] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и выполняет функцию антагониста (например, снижает или ингибирует активность CD96).

[00359] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и снижает или ингибирует активность CD96 (например, CD96 человека или CD96 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 посредством способов, описанных в данном документе и/или известных специалисту в данной области техники, относительно активности CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) без какой-либо полиспецифической молекулы или с неродственной полиспецифической молекулой (например, полиспецифической молекулой, которая не связывается специфически с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака)). В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96

яванского макака) и снижает или ингибирует активность CD96 (например, CD96 человека или CD96 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, 100 раз или больше, как оценено посредством способов, описанных в данном документе и/или известных специалисту в данной области техники, относительно активности CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) без какой-либо полиспецифической молекулы или с неродственной полиспецифической молекулой (например, полиспецифической молекулой, которая не связывается специфически с CD96 (например, CD96 человека)). Неограничивающие примеры активности CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) могут включать передачу сигнала CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака); связывание CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) с его лигандом (например, CD155) или его фрагментом и/или слитым белком); активацию Т-клетки (например, Т-клетки, экспрессирующей CD96 человека); активацию естественного киллера (NK); снижение или ингибирование Treg; повышение продуцирования цитокинов (например, IL-2); повышение активности CD155 (например, CD155 человека). В конкретных вариантах осуществления повышение активности CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) оценивают так, как описано в разделе «Примеры».

[00360] В конкретных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и снижает или ингибирует связывание CD96 (например, CD96 человека или CD96 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 посредством способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники, относительно связывания CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) с данным лигандом без какой-либо полиспецифической молекулы или с неродственной полиспецифической молекулой (например, полиспецифической молекулой, которая не связывается специфически с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака)). В конкретных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и повышает связывание CD96 (например, CD96 человека или CD96 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 посредством способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области

техники, относительно связывания CD96 (например, CD96 человека) с данным лигандом без какой-либо полиспецифической молекулы или с неродственной полиспецифической молекулой (например, антителом, которое специфически не связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака)).

[00361] В конкретных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и активирует Т-клетку (например, Т-клетку, экспрессирующую CD96 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 CD96-экспрессирующей клеткой Jurkat. В определенных вариантах осуществления раскрытая в данном документе полиспецифическая молекула 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 посредством способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники, относительно активности NFAT без какой-либо полиспецифической молекулы или с неродственной полиспецифической молекулой (например, полиспецифической молекулой, которая не связывается специфически с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака)). В определенных вариантах осуществления раскрытая в данном документе полиспецифическая молекула 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 больше, как оценено посредством способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники, относительно активности NFAT без какой-либо полиспецифической молекулы или с неродственной полиспецифической молекулой (например, полиспецифической молекулой, которая не связывается специфически с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака)). В определенных вариантах осуществления полиспецифическая молекула повышает активность NFAT в присутствии лиганда CD96 (например, CD155) или его фрагмента, и/или слитого белка, и/или клетки, экспрессирующей лиганд CD96 (например, моноцита или дендритной клетки).

[00362] В конкретных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 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 посредством способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники, относительно продуцирования цитокинов без какой-либо полиспецифической молекулы или с неродственной полиспецифической

молекулой (например, полиспецифической молекулой, которая не связывается специфически с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака)). В конкретных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 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 посредством способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники, относительно продуцирования цитокинов без какой-либо полиспецифической молекулы или с неродственной полиспецифической молекулой (например, полиспецифической молекулой, которая не связывается специфически с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака)). В определенных вариантах осуществления полиспецифическая молекула повышает продуцирование цитокинов (например, IL-2) в присутствии лиганда CD96 (например, CD155) или его фрагмента, и/или слитого белка, и/или клетки, экспрессирующей лиганд CD96 (например, моноцита или дендритной клетки). В определенных вариантах осуществления полиспецифическая молекула повышает продуцирование IL-2 относительно продуцирования IL-2 без какой-либо полиспецифической молекулы или с неродственной полиспецифической молекулой (например, антителом, которое не связывается специфически с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака)).

[00363] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и которая 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 посредством способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники, относительно продуцирования IFN γ и/или IL-2 без какой-либо полиспецифической молекулы или с неродственной полиспецифической молекулой (например, полиспецифической молекулой, которая не связывается специфически с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака)).

[00364] В определенных вариантах осуществления стимулированные энтеротоксином А стафилококка (SEA) мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) человека в присутствии описанной в данном документе полиспецифической молекулы, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или

CD96 яванского макака), характеризуются повышенным 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, стимулированных только SEA без какой-либо полиспецифической молекулы или с неродственной полиспецифической молекулой (например, полиспецифической молекулой, которая не связывается специфически с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака)), как оценено посредством способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники.

[00365] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 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 полиспецифическая молекула повышает количество пролиферирующих Т-клеток памяти при контакте Т-клеток памяти с их когнатным антигеном(антигенами) 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 посредством способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники, относительно количества пролиферирующих Т-клеток памяти при контакте Т-клеток памяти с их когнатным антигеном(антигенами) в отсутствие какой-либо полиспецифической молекулы или в присутствии неродственной полиспецифической молекулы (*например*, полиспецифической молекулы, которая не связывается специфически с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака)). В определенных вариантах осуществления полиспецифическая молекула повышает продуцирование цитокина (например, IFN γ , TNF α) из Т-клетки памяти при контакте Т-клетки памяти с ее когнатным антигеном 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 посредством способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники, относительно продуцирования цитокина из Т-клетки памяти при контакте Т-клетки памяти с ее когнатным антигеном в отсутствие какой-либо полиспецифической молекулы или в присутствии неродственной полиспецифической молекулы (например, полиспецифической молекулы, которая не связывается специфически с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака)).

[00366] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, которая специфически связывается с CD96

(например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и активирует NK-клетку. В определенных вариантах осуществления NK-клетки являются выделенными. В определенных вариантах осуществления NK-клетки находятся в смешанной культуре РВМС. В определенных вариантах осуществления раскрытая в данном документе полиспецифическая молекула повышает уровень экспрессии CD107a в NK-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 посредством способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники, относительно уровня экспрессии CD107a в NK-клетках без какой-либо полиспецифической молекулы или с неродственной полиспецифической молекулой (например, антителом, которое не связывается специфически с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака)). В определенных вариантах осуществления раскрытая в данном документе полиспецифическая молекула повышает уровень экспрессии CD107a в NK-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 посредством способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники, относительно уровня экспрессии CD107a в NK-клетках без какой-либо полиспецифической молекулы или с неродственной полиспецифической молекулой (например, полиспецифической молекулой, которая не связывается специфически с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака)). В определенных вариантах осуществления раскрытая в данном документе полиспецифическая молекула повышает продуцирование цитокинов (например, IFN γ и/или TNF α) из NK-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 посредством способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники, относительно продуцирования цитокинов (например, IFN γ и/или TNF α) из NK-клеток без какой-либо полиспецифической молекулы или с неродственной полиспецифической молекулой (например, полиспецифической молекулой, которая не связывается специфически с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака)). В определенных вариантах осуществления раскрытая в данном документе полиспецифическая молекула повышает продуцирование цитокинов (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 посредством способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники, относительно продуцирования цитокинов (например, IFN γ и/или TNF α) из NK-клеток без какой-либо полиспецифической молекулы или с неродственной полиспецифической молекулой (например, полиспецифической молекулой, которая не связывается специфически с CD96

(например, CD96 человека или CD96 яванского макака)).

[00367] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) и выполняет функцию антагониста (например, снижает или ингибирует активность TIGIT).

[00368] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) и снижает 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 посредством способов, описанных в данном документе и/или известных специалисту в данной области техники, относительно активности TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) без какой-либо полиспецифической молекулы или с неродственной полиспецифической молекулой (например, полиспецифической молекулой, которая не связывается специфически с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)). В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) и снижает 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, 100 раз или больше, как оценено посредством способов, описанных в данном документе и/или известных специалисту в данной области техники, относительно активности TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) без какой-либо полиспецифической молекулы или с неродственной полиспецифической молекулой (например, полиспецифической молекулой, которая не связывается специфически с TIGIT (например, TIGIT человека)). Неограничивающие примеры активности TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) могут включать передачу сигнала 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 естественного киллера (NK); снижение или ингибирование Treg; повышение продуцирования цитокина (например, IL-2); повышение активности CD155 (например, CD155 человека). В конкретных вариантах осуществления повышение активности TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) оценивают, как описано в разделе «Примеры».

[00369] В конкретных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) и снижает 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 посредством 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 какой-либо полиспецифической молекулы или с неродственной полиспецифической молекулой (например, полиспецифической молекулой, которая не связывается специфически с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)). В конкретных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, которая 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 посредством способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники, относительно связывания TIGIT (например, TIGIT человека) с данным лигандом без какой-либо полиспецифической молекулы или с неродственной полиспецифической молекулой (например, антителом, которое не связывается специфически с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)).

[00370] В конкретных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, которая 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 раскрытая в данном документе полиспецифическая молекула 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 посредством способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники, относительно активности NFAT без какой-либо полиспецифической молекулы или с неродственной полиспецифической молекулой (например, полиспецифической молекулой, которая не связывается специфически с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)). В определенных вариантах осуществления раскрытая в данном документе полиспецифическая молекула 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 больше, как оценено посредством способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники, относительно активности NFAT без какой-либо полиспецифической молекулы или с неродственной полиспецифической молекулой (например, полиспецифической молекулой, которая не связывается специфически с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)). В определенных вариантах осуществления полиспецифическая молекула 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).

[00371] В конкретных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, которая 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 посредством способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники, относительно продуцирования цитокинов без какой-либо полиспецифической молекулы или с неродственной полиспецифической молекулой (например, полиспецифической молекулой, которая не связывается специфически с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)). В конкретных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, которая 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 посредством способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники, относительно продуцирования цитокинов без какой-либо полиспецифической молекулы или с неродственной полиспецифической молекулой (например, полиспецифической молекулой, которая не связывается специфически с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)). В определенных вариантах осуществления полиспецифическая молекула 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 полиспецифическая молекула повышает продуцирование IL-2 относительно продуцирования IL-2 без какой-либо полиспецифической молекулы или с неродственной полиспецифической молекулой (например, антителом, которое не связывается специфически с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)).

[00372] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) и которая 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 посредством способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники, относительно продуцирования IFN γ и/или IL-2 без какой-либо полиспецифической молекулы или с неродственной полиспецифической молекулой (например, полиспецифической молекулой, которая не связывается специфически с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)).

[00373] В определенных вариантах осуществления стимулированные энтеротоксином А стафилококка (SEA) мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) человека в присутствии описанной в данном документе полиспецифической молекулы, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), характеризуются повышенным 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, стимулированных только SEA без какой-либо полиспецифической молекулы или с неродственной полиспецифической молекулой (например, полиспецифической молекулой, которая не связывается специфически с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)), как оценено посредством способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники.

[00374] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена молекула, которая 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 полиспецифическая молекула повышает количество пролиферирующих Т-клеток памяти при контакте Т-клеток памяти с их когнатным антигеном(антигенами) 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 посредством способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники, относительно количества пролиферирующих Т-

клеток памяти при контакте Т-клеток памяти с их когнатным антигеном(антигенами) в отсутствие какой-либо полиспецифической молекулы или в присутствии неродственной полиспецифической молекулы (например, полиспецифической молекулы, которая не связывается специфически с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)). В определенных вариантах осуществления полиспецифическая молекула повышает продуцирование цитокина (например, $IFN\gamma$, $TNF\alpha$) из Т-клетки памяти при контакте Т-клетки памяти с ее когнатным антигеном 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 посредством способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники, относительно продуцирования цитокина из Т-клетки памяти при контакте Т-клетки памяти с ее когнатным антигеном в отсутствие какой-либо полиспецифической молекулы или в присутствии неродственной полиспецифической молекулы (например, полиспецифической молекулы, которая не связывается специфически с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)).

[00375] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, которая специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) и активирует NK-клетку. В определенных вариантах осуществления NK-клетки являются выделенными. В определенных вариантах осуществления NK-клетки находятся в смешанной культуре РВМС. В определенных вариантах осуществления раскрытая в данном документе полиспецифическая молекула повышает уровень экспрессии CD107a в NK-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 посредством способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники, относительно уровня экспрессии CD107a в NK-клетках без какой-либо полиспецифической молекулы или с неродственной полиспецифической молекулой (например, антителом, которое не связывается специфически с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)). В определенных вариантах осуществления раскрытая в данном документе полиспецифическая молекула повышает уровень экспрессии CD107a в NK-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 посредством способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники, относительно уровня экспрессии CD107a в NK-клетках без какой-либо полиспецифической молекулы или с неродственной полиспецифической молекулой (например, полиспецифической молекулой, которая не связывается специфически с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)). В определенных вариантах осуществления раскрытая в данном документе

полиспецифическая молекула повышает продуцирование цитокинов (например, IFN γ и/или TNF α) из NK-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 посредством способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники, относительно продуцирования цитокинов (например, IFN γ и/или TNF α) из NK-клеток без какой-либо полиспецифической молекулы или с неродственной полиспецифической молекулой (например, полиспецифической молекулой, которая не связывается специфически с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)). В определенных вариантах осуществления раскрытая в данном документе полиспецифическая молекула повышает продуцирование цитокинов (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 посредством способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники, относительно продуцирования цитокинов (например, IFN γ и/или TNF α) из NK-клеток без какой-либо полиспецифической молекулы или с неродственной полиспецифической молекулой (например, полиспецифической молекулой, которая не связывается специфически с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)).

[00376] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) и выполняет функцию антагониста (например, снижает или ингибирует активность CD96 и TIGIT).

[00377] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) и снижает или ингибирует активность CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и 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 посредством способов, описанных в данном документе и/или известных специалисту в данной области техники, относительно активности CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) без какой-либо полиспецифической молекулы или с неродственной полиспецифической молекулой (например, полиспецифической молекулой, которая не связывается специфически с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) или TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)). В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или

CD96 яванского макака) и TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) и снижает или ингибирует активность CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и 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, 100 раз или больше, как оценено посредством способов, описанных в данном документе и/или известных специалисту в данной области техники, относительно активности CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) без какой-либо полиспецифической молекулы или с неродственной полиспецифической молекулой (например, полиспецифической молекулой, которая не связывается специфически с CD96 (например, CD96 человека) или TIGIT (например, TIGIT человека)). Неограничивающие примеры активности CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) могут включать передачу сигнала CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака); связывание CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) с его лигандом (например, CD155) или его фрагментом и/или слитым белком; активацию T-клетки (например, T-клетки, экспрессирующей CD96 человека и/или TIGIT); активацию естественного киллера (NK); снижение или ингибирование Treg; повышение продуцирования цитокина (например, IL-2); повышение активности CD155 (например, CD155 человека). В конкретных вариантах осуществления повышение активности CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) оценивают так, как описано в разделе «Примеры».

[00378] В конкретных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) и снижает или ингибирует связывание CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) или 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 посредством способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники, относительно связывания CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) с данным лигандом без какой-либо полиспецифической молекулы или с неродственной полиспецифической молекулой (например, полиспецифической молекулой, которая не связывается специфически с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) или TIGIT (например, TIGIT

человека или TIGIT яванского макака)). В конкретных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) и повышает связывание CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и 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 посредством способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники, относительно связывания CD96 (например, CD96 человека) и TIGIT (например, TIGIT человека) с данным лигандом без какой-либо полиспецифической молекулы или с неродственной полиспецифической молекулой (например, антителом, которое не связывается специфически с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) или TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)).

[00379] В конкретных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) и активирует Т-клетку (например, Т-клетку, экспрессирующую CD96 человека и/или 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 CD96-экспрессирующей и/или TIGIT-экспрессирующей клеткой Jurkat. В определенных вариантах осуществления раскрытая в данном документе полиспецифическая молекула 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 посредством способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники, относительно активности NFAT без какой-либо полиспецифической молекулы или с неродственной полиспецифической молекулой (например, полиспецифической молекулой, которая не связывается специфически с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) или TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)). В определенных вариантах осуществления раскрытая в данном документе полиспецифическая молекула 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 больше, как оценено посредством способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники, относительно активности NFAT без

какой-либо полиспецифической молекулы или с неродственной полиспецифической молекулой (например, полиспецифической молекулой, которая не связывается специфически с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) или TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)). В определенных вариантах осуществления полиспецифическая молекула повышает активность NFAT в присутствии лиганда CD96 и/или TIGIT (например, CD155) или его фрагмента, и/или слитого белка, и/или клетки, экспрессирующей лиганд CD96 и/или TIGIT (например, моноцита или дендритной клетки).

[00380] В конкретных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и 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 посредством способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники, относительно продуцирования цитокинов без какой-либо полиспецифической молекулы или с неродственной полиспецифической молекулой (например, полиспецифической молекулой, которая не связывается специфически с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) или TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)). В конкретных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и 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 посредством способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники, относительно продуцирования цитокинов без какой-либо полиспецифической молекулы или с неродственной полиспецифической молекулой (например, полиспецифической молекулой, которая не связывается специфически с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) или TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)). В определенных вариантах осуществления полиспецифическая молекула повышает продуцирование цитокинов (например, IL-2) в присутствии лиганда CD96 и/или TIGIT (например, CD155) или его фрагмента, и/или слитого белка, и/или клетки, экспрессирующей лиганд CD96 и/или TIGIT (например, моноцита или дендритной клетки). В определенных вариантах осуществления полиспецифическая молекула повышает продуцирование IL-2 относительно продуцирования IL-2 без какой-либо полиспецифической молекулы или с неродственной полиспецифической молекулой (например, антителом, которое не связывается специфически с CD96 (например, CD96

человека или CD96 яванского макака) или TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)).

[00381] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) и которая 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 посредством способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники, относительно продуцирования IFN γ и/или IL-2 без какой-либо полиспецифической молекулы или с неродственной полиспецифической молекулой (например, полиспецифической молекулой, которая не связывается специфически с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) или TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)).

[00382] В определенных вариантах осуществления стимулированные энтеротоксином А стафилококка (SEA) мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) человека в присутствии описанной в данном документе полиспецифической молекулы, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), характеризуются повышенным 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, стимулированных только SEA без какой-либо полиспецифической молекулы или с неродственной полиспецифической молекулой (например, полиспецифической молекулой, которая не связывается специфически с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) или TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)), как оценено посредством способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники.

[00383] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена молекула, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и 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 полиспецифическая молекула повышает количество пролиферирующих Т-клеток памяти при контакте Т-клеток памяти с их когнатным антигеном(антигенами) 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 посредством способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники, относительно количества пролиферирующих Т-клеток памяти при контакте Т-клеток памяти с их когнатным антигеном(антигенами) в отсутствие какой-либо полиспецифической молекулы или в присутствии неродственной полиспецифической молекулы (например, полиспецифической молекулы, которая не связывается специфически с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) или TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)). В определенных вариантах осуществления полиспецифическая молекула повышает продуцирование цитокина (например, $IFN\gamma$, $TNF\alpha$) из Т-клетки памяти при контакте Т-клетки памяти с ее когнатным антигеном 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 посредством способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники, относительно продуцирования цитокина из Т-клетки памяти при контакте Т-клетки памяти с ее когнатным антигеном в отсутствие какой-либо полиспецифической молекулы или в присутствии неродственной полиспецифической молекулы (например, полиспецифической молекулы, которая не связывается специфически с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) или TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)).

[00384] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена полиспецифическая молекула, которая специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) и активирует NK-клетку. В определенных вариантах осуществления NK-клетки являются выделенными. В определенных вариантах осуществления NK-клетки находятся в смешанной культуре PBMC. В определенных вариантах осуществления раскрытая в данном документе полиспецифическая молекула повышает уровень экспрессии CD107a в NK-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 посредством способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники, относительно уровня экспрессии CD107a в NK-клетках без какой-либо полиспецифической молекулы или с неродственной полиспецифической молекулой (например, антителом, которое не связывается специфически с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) или TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)). В определенных вариантах осуществления раскрытая в данном документе полиспецифическая молекула

повышает уровень экспрессии CD107a в NK-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 посредством способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники, относительно уровня экспрессии CD107a в NK-клетках без какой-либо полиспецифической молекулы или с неродственной полиспецифической молекулой (например, полиспецифической молекулой, которая не связывается специфически с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) или TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)). В определенных вариантах осуществления раскрытая в данном документе полиспецифическая молекула повышает продуцирование цитокинов (например, IFN γ и/или TNF α) из NK-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 посредством способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники, относительно продуцирования цитокинов (например, IFN γ и/или TNF α) из NK-клеток без какой-либо полиспецифической молекулы или с неродственной полиспецифической молекулой (например, полиспецифической молекулой, которая не связывается специфически с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) или TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)). В определенных вариантах осуществления раскрытая в данном документе полиспецифическая молекула повышает продуцирование цитокинов (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 посредством способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники, относительно продуцирования цитокинов (например, IFN γ и/или TNF α) из NK-клеток без какой-либо полиспецифической молекулы или с неродственной полиспецифической молекулой (например, полиспецифической молекулой, которая не связывается специфически с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) или TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)).

[00385] 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, снижает или ингибирует активность TIGIT).

[00386] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) и снижает 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 посредством 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 снижает 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, 100 раз или больше, как оценено посредством 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 сигнала 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 естественного киллера (NK); снижение или ингибирование Treg; повышение продуцирования цитокина (например, IL-2); повышение активности CD155 (например, CD155 человека). В конкретных вариантах осуществления повышение активности TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) оценивают, как описано в разделе «Примеры».

[00387] В конкретных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) и снижает 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 посредством 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 не связывается специфически 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 посредством 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)).

[00388] 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 посредством 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 не связывается специфически 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 больше, как оценено посредством 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).

[00389] 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 посредством 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 посредством 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)).

[00390] 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 посредством 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 не связывается специфически с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)).

[00391] В определенных вариантах осуществления стимулированные 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 повышенным продуцированием $IFN\gamma$ 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 $IFN\gamma$ и/или $IL-2$ из РВМС, стимулированных только 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 посредством способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники.

[00392] 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 количество пролиферирующих Т-клеток памяти при приведении Т-клеток памяти в контакт с их когнатным антигеном(антигенами) 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 посредством способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники, относительно количества пролиферирующих Т-клеток памяти при приведении Т-клеток памяти в контакт с их когнатным антигеном(антигенами) 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 когнатным антигеном 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 посредством 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 когнатным антигеном 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)).

[00393] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрено выделенное антитело, которое специфически связывается с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) и активирует NK-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 посредством 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 посредством 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 цитокинов (например, IFN γ и/или TNF α) 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 посредством способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники, относительно продуцирования цитокинов (например, IFN γ и/или TNF α) из НК-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 цитокинов (например, IFN γ и/или TNF α) из НК-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 посредством способов, описанных в данном документе или известных специалисту в данной области техники, относительно продуцирования цитокинов (например, IFN γ и/или TNF α) из НК-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

[00394] В данном документе предусмотрены композиции, содержащие полиспецифическую молекулу к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского

макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) или выделенное антитело к TIGIT, раскрытые в данном документе, имеющие требуемую степень 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); полипептиды с низкой молекулярной массой (менее чем приблизительно 10 остатков) ; 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).

[00395] В конкретном варианте осуществления фармацевтические композиции содержат полиспецифическую молекулу к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) или выделенное антитело к TIGIT, раскрытые в данном документе, и необязательно одно или более дополнительных профилактических или терапевтических средств в фармацевтически приемлемом носителе. В конкретном варианте осуществления фармацевтические композиции содержат эффективное количество полиспецифической молекулы к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) или выделенного антитела к TIGIT, предусмотренных в данном документе, и необязательно одно или более дополнительных профилактических или терапевтических средств в фармацевтически приемлемом носителе. В определенных вариантах осуществления полиспецифическая молекула или антитело являются единственным активным ингредиентом, включенным в фармацевтическую композицию. Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, можно использовать для повышения или стимуляции активности CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) и лечения состояния, такого как рак или инфекционное заболевание. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции по настоящему изобретению, содержащей полиспецифическую молекулу к CD96 (например, CD96 человека или CD96

яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) или выделенное антитело 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.

[00396] 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, секвестрирующие или хелатирующие средства и другие фармацевтические 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, хлорбутанол, 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.

[00397] 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.

[00398] Препараты для парентерального введения полиспецифической молекулы или антитела включают стерильные растворы, подготовленные для инъекции, стерильные сухие растворимые продукты, такие как лиофилизированные порошки, подготовленные к смешиванию с растворителем непосредственно перед применением, в том числе таблетки для подкожных инъекций, подготовленные для инъекции стерильные суспензии, стерильные сухие нерастворимые продукты, подготовленные к смешиванию со средой-носителем непосредственно перед применением, и стерильные эмульсии. Растворы могут быть либо водными, либо неводными.

[00399] При внутривенном введении подходящие носители включают физиологический раствор или фосфатно-солевой буферный раствор (PBS) и растворы, содержащие загущающие и солюбилизующие средства, такие как глюкоза, полиэтиленгликоль и полипропиленгликоль, а также их смеси.

[00400] Смеси для местного применения, содержащие антитела, получают так, как описано для местного и системного введения. Полученная смесь может представлять собой раствор, суспензию, эмульсии 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.

[00401] Полиспецифическая молекула к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) или выделенное антитело к TIGIT, раскрытые в данном документе, могут быть составлены 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 они 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.

[00402] Полиспецифическая молекула к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) или выделенное антитело к TIGIT, раскрытые в данном документе, могут быть составлены

для очагового 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 глаз 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.

[00403] 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.

[00404] В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция, содержащая описанные в данном документе полиспецифическую молекулу или 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 описанных в данном документе полиспецифической молекулы или антитела или их 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 рН. 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 лиофилизированного 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.

[00405] Полиспецифические молекулы к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) и выделенные антитела к TIGIT, раскрытые в данном документе, и другие композиции, предусмотренные в данном документе, также могут быть составлены для нацеливания 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 описанные в данном документе полиспецифическая молекула или антитело нацеливаются на опухоль.

[00406] 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

[00407] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения субъекта с применением полиспецифической молекулы к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) и выделенных антител к TIGIT, раскрытых в данном документе. Любое заболевание или нарушение у субъекта, который получит пользу от снижения функции CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), можно лечить с применением полиспецифических молекул к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) и выделенных антител к TIGIT, раскрытых в данном документе. 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).

[00408] Полиспецифическая молекула к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) и выделенные антитела к TIGIT, раскрытые в данном документе, в частности, применимы для ингибирования толерантности иммунной системы к опухолям и, соответственно,

могут применяться в качестве средства иммунотерапии для субъектов с раком. Например, в определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ повышения активации Т-клеток (например, CD8⁺ цитотоксических Т-клеток, CD4⁺ хелперных 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 полиспецифической молекулы к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), или выделенного антитела к TIGIT, или фармацевтической композиции на их 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.

[00409] Виды рака, которые можно лечить с помощью полиспецифических молекул к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), или выделенных антител к TIGIT, или фармацевтических композиций, раскрытых в данном документе, включают без ограничения солидную опухоль, гематологический рак (например, лейкоз, лимфому, миелому, например, множественную миелому) и метастатический очаг. 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, уретерия, 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).

[00410] 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 поздней стадии), рака почки (например, почечноклеточной 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 рецептора эстрогена, рецептора прогестерона 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.

[00411] 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 В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), диффузную В-крупноклеточную лимфому с активированными В-клетками (ABC), диффузную В-крупноклеточную лимфому 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 маргинальной зоны. В определенных вариантах осуществления рак является миеломой, например, множественной миеломой.

[00412] В другом варианте осуществления рак выбран из карциномы (например, карциномы на поздних стадиях или метастатической карциномы), меланомы или карциномы легкого, например, немелкоклеточной карциномы легкого.

[00413] В определенных вариантах осуществления рак представляет собой рак легкого, например, аденокарциному легкого, немелкоклеточный рак легкого или мелкоклеточный рак легкого.

[00414] 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 еще одних вариантах осуществления полиспецифические молекулы к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), выделенные антитела к TIGIT или фармацевтическую композицию, раскрытые в данном документе, вводят после лечения с помощью антитела к CTLA-4 (например, ипилиумаба) с ингибитором BRAF (например, вемурафенибом или дабрафенибом) или без него.

[00415] В другом варианте осуществления рак представляет собой гепатокарциному, например, гепатокарциному на поздних стадиях, с вирусной инфекцией или без нее, например, хроническим вирусным гепатитом.

[00416] В другом варианте осуществления рак является раком предстательной железы, например, раком предстательной железы на поздних стадиях.

[00417] В еще одном варианте осуществления рак является миеломой, например, множественной миеломой.

[00418] В еще одном варианте осуществления рак является раком почки, например, почечноклеточной карциномой (RCC) (например, метастатической RCC, светлоклеточной почечноклеточной карциномой (CCRCC) или папиллярной почечноклеточной карциномой).

[00419] В еще одном варианте осуществления рак выбран из рака легкого, меланомы, рака почки, рака молочной железы, колоректального рака, лейкоза или метастатического поражения при раке.

[00420] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ предупреждения или лечения инфекционного заболевания у субъекта, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества полиспецифической молекулы к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), или выделенного антитела к TIGIT, или фармацевтической композиции на их 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 полиспецифическая молекула к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) или выделенное антитело к TIGIT, описанные в данном документе, или композиция на их основе, представляют собой единственное активное средство, вводимое субъекту. В определенных вариантах осуществления полиспецифическую молекулу к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского

макака) или выделенное антитело к TIGIT, описанные в данном документе, или композицию на их основе применяют в комбинации с противоинфекционными мерами (например, противовирусными, антибактериальными, противогрибковыми или противогельминтными средствами) для лечения инфекционных заболеваний. Таким образом, в одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к полиспецифической молекуле или антителу и/или к 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 противоинфекционными мерами.

[00421] Инфекционные заболевания, которые можно лечить и/или предупреждать с помощью полиспецифических молекул к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), выделенных антител к TIGIT или фармацевтических композиций, раскрытых в данном документе, вызываются возбудителями инфекции, в том числе без ограничения бактериями, паразитами, грибами, простейшими и вирусами. В конкретном варианте осуществления инфекционное заболевание, которое лечат и/или предупреждают с помощью полиспецифических молекул к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), выделенных антител к TIGIT или фармацевтических композиций, раскрытых в данном документе, вызывается вирусом. Вирусные заболевания или вирусные инфекции, которые можно предупреждать и/или лечить в соответствии с описанными в данном документе способами, включают без ограничения вызываемые 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.

[00422] 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, вызываемые бактериями (например, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus viridans* и *Pseudomonas aeruginosa*), которые можно предупреждать и/или

лечить в соответствии с описанными в данном документе способами, включают без ограничения заболевания, вызываемые *Mycobacteria rickettsia*, *Mycoplasma*, *Neisseria*, *S. pneumonia*, *Borrelia burgdorferi* (болезнь Лайма), *Bacillus anthracis* (сибирская язва), возбудителем столбняка, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, микобактерией, возбудителями коклюша, холеры, чумы, дифтерии, хламидиями, *S. aureus* и легионеллой.

[00423] Вызываемые простейшими протозойные заболевания или протозойные инфекции, которые можно предупреждать 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.

[00424] 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.

[00425] 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 антитела к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) или фармацевтические композиции, раскрытые в данном документе, обеспечивают синергический эффект со средством, нацеливающимся на контрольную точку иммунного ответа.

[00426] В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к полиспецифической молекуле, 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 (а) полиспецифической молекуле, 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 (а) полиспецифической молекуле, 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 (а) полиспецифическую молекулу или 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.

[00427] 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 MK-3475, разработанный Merck & Co. В определенных вариантах осуществления антителом к PD-1 является пидилизумаб, также известный как CT-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.

[00428] 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; патентная публикация США № US 2013/0202623 A1; патентная публикация США № US 2013/0291136 A1; патентная публикация США № US 2014/0044738 A1; патентная публикация США № US 2014/0356363 A1; патентная публикация США № US 2016/0075783 A1 и патентная публикация согласно PCT № WO 2013/033091 A1; патентная публикация согласно PCT № WO 2015/036394 A1; патентная публикация согласно PCT № WO 2014/179664 A2; патентная публикация согласно PCT № WO 2014/209804 A1; патентная публикация согласно PCT № WO 2014/206107 A1; патентная публикация согласно PCT № WO 2015/058573 A1; патентная публикация согласно PCT № WO 2015/085847 A1; патентная публикация согласно PCT № WO 2015/200119 A1; патентная публикация согласно PCT № WO 2016/015685 A1 и патентная публикация согласно PCT № WO 2016/020856 A1.

[00429] 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.

[00430] 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; патентная публикация США № U.S.

2010/0203056 A1; патентная публикация США № U.S. 2003/0232323 A1; патентная публикация США № U.S. 2013/0323249 A1; патентная публикация США № U.S. 2014/0341917 A1; патентная публикация США № U.S. 2014/0044738 A1; патентная публикация США № U.S. 2015/0203580 A1; патентная публикация США № U.S. 2015/0225483 A1; патентная публикация США № U.S. 2015/0346208 A1; патентная публикация США № U.S. 2015/0355184 A1 и патентная публикация согласно PCT № WO 2014/100079 A1; патентная публикация согласно PCT № WO 2014/022758 A1; патентная публикация согласно PCT № WO 2014/055897 A2; патентная публикация согласно PCT № WO 2015/061668 A1; патентная публикация согласно PCT № WO 2015/109124 A1; патентная публикация согласно PCT № WO 2015/195163 A1; патентная публикация согласно PCT № WO 2016/000619 A1 и патентная публикация согласно PCT № WO 2016/030350 A1.

[00431] 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.

[00432] В определенных вариантах осуществления полиспецифическую молекулу к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) или выделенное антитело к TIGIT, раскрытые в данном документе, вводят субъекту в комбинации с соединением, которое нацеливается на иммуномодулирующий фермент(ферменты), такой как IDO (индоламин-(2,3)-диоксигеназа) и/или TDO (триптофан-2,3-диоксигеназа). Таким образом, в определенных вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство представляет собой соединение, которое нацеливается на иммуномодулирующий фермент(ферменты), такой как ингибитор индоламин-(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 полиспецифическую молекулу к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) или выделенное антитело к TIGIT, раскрытые в данном документе, 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, описанные в данном документе полиспецифическую молекулу или антитело и описанный в данном документе ингибитор IDO можно вводить отдельно, последовательно или одновременно в виде отдельных лекарственных форм. В определенных вариантах осуществления полиспецифическую молекулу или 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.

[00433] В определенных вариантах осуществления полиспецифическую молекулу к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) или выделенное антитело к TIGIT, раскрытые в данном документе, 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 полиспецифическую молекулу к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) или выделенное антитело к TIGIT, раскрытые в данном документе, 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 МНС 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) полиспецифической молекуле, 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) полиспецифическую молекулу, 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.

[00434] 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 пептид(пептиды) проявляет антигенность в отношении подвергаемого лечению рака. HSPPC эффективно захватываются посредством APC через мембранные рецепторы (главным образом 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.

[00435] 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 посредством 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.

[00436] 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.

[00437] В конкретном варианте осуществления полиспецифическую молекулу к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) или выделенное антитело к TIGIT, раскрытые в данном документе, вводят субъекту в комбинации с комплексом белок теплового шока-пептид (HSPPC), например, комплексом-96 белок теплового шока-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 этот 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.

[00438] 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, HSPCC-96. В таких вариантах осуществления дозы HSPPC, например, HSPPC-96, можно вводить один раз в неделю для первых 4 доз, а затем один раз в две недели для 2-8 дополнительных доз.

[00439] 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.

[00440] В определенных вариантах осуществления полиспецифическую молекулу к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) или выделенное антитело к TIGIT, раскрытые в данном документе, вводят субъекту в комбинации с адъювантом. В зависимости от специфики лечения можно применять различные адъюванты. Неограничивающие примеры подходящих адъювантов включают без ограничения полный адъювант Фрейнда (CFA), неполный адъювант Фрейнда (IFA), монтанид ISA (неполный адъювант Seppic), систему адъювантов Ribi (RAS), Titer Max, мурамиловые пептиды, состав на основе адъюванта Syntex (SAF), алюминиевые квасцы (гидроксид алюминия и/или фосфат алюминия), адъюванты на основе солей алюминия, адъюванты 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 маннансвязывающего лектина (MBL), агонисты STING, иммуностимулирующие комплексы, такие как сапонины, Quil A, QS-21, QS-7, ISCOMATRIX и другие. Другие адъюванты включают олигонуклеотиды CpG и молекулы двухнитевой РНК, такие как поли(А) и поли(U). Также можно применять комбинации вышеуказанных адъювантов. 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 адъювант представляет собой QS-21 STIMULON.

[00441] В определенных вариантах осуществления полиспецифическую молекулу к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) или выделенное антитело к TIGIT, раскрытые в данном документе, 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 полиспецифической молекуле, 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.

[00442] В определенных вариантах осуществления полиспецифическую молекулу к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) или выделенное антитело к TIGIT, раскрытые в данном документе, вводят субъекту в комбинации с клеткой, экспрессирующей химерный антигенный рецептор (CAR). В определенных вариантах осуществления клетка является Т-клеткой.

[00443] В определенных вариантах осуществления полиспецифическую молекулу к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) или выделенное антитело к TIGIT, раскрытые в данном документе, вводят субъекту в комбинации с антителом, имитирующим TCR. В определенных вариантах осуществления имитирующее TCR антитело является антителом, которое специфически связывается с комплексом пептид-МНС. 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.

[00444] В определенных вариантах осуществления полиспецифическую молекулу к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) или выделенное антитело к TIGIT, раскрытые в данном документе, вводят субъекту в комбинации с привлекающим Т-клетки биспецифическим активатором (BiTE) (например, описанным в WO2005061547A2, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте) и/или антителом с двойной аффинностью для повторного нацеливания (DART) (например, описанным в WO2012162067A2, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В определенных вариантах осуществления BiTE и/или DART специфически связываются с опухолеассоциированным 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 опухолеассоциированный антиген, представляет собой EGFR (например, EGFR человека), где необязательно BiTE и/или DART содержат последовательности VH и VL цетуксимаба. В определенных вариантах осуществления опухолеассоциированный

антиген, представляет собой Her2 (например, Her2 человека), где необязательно ViTE и/или DART содержат последовательности VH и VL трастузамаба. В определенных вариантах осуществления опухолеассоциированный антиген представляет собой CD20 (например, CD20 человека).

[00445] Полиспецифическую молекулу к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) или выделенное антитело к TIGIT и дополнительное терапевтическое средство (например, химиотерапевтическое, радиотерапевтическое, 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 полиспецифическую молекулу к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) или выделенное антитело к TIGIT вводят парентерально и ингибитор DO вводят перорально.

[00446] 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 полиспецифическую молекулу, антитело или фармацевтическую композицию доставляют подкожно или внутривенно. В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе полиспецифическую молекулу, антитело или фармацевтическую композицию доставляют внутриартериально. В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе полиспецифическую молекулу, антитело или фармацевтическую композицию доставляют внутрь опухоли. В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе полиспецифическую молекулу, антитело или фармацевтическую композицию доставляют в лимфатический узел, дренирующий опухоль.

[00447] Количество полиспецифической молекулы, антитела или композиции, которое будет эффективным при лечении и/или предупреждении состояния, будет зависеть от природы заболевания и может быть определено стандартными клиническими методиками.

[00448] 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.

[00449] Полиспецифическую молекулу к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) или выделенное антитело к TIGIT, описанные в данном документе, также можно применять для анализа уровней белка CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) в биологическом образце с применением классических иммуногистологических методов, 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 полиспецифической молекулы или антитела, описанных в данном документе. В качестве альтернативы вторая полиспецифическая молекула или антитело, которое распознает полиспецифическую молекулу к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), или выделенное антитело к TIGIT, описанные в данном документе, могут быть мечеными и применяться в комбинации с полиспецифической молекулой к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) или выделенным антителом к TIGIT для выявления уровней белка CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака). Таким образом, в определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению полиспецифической молекулы к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) или выделенного антитела к TIGIT по настоящему изобретению для выявления *in vitro* белка CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) в биологическом образце. В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению полиспецифической молекулы к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) или

выделенного антитела к TIGIT по настоящему изобретению для анализа и/или выявления уровней белка CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) в биологическом образце *in vitro*, где необязательно полиспецифическая молекула к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) или выделенное антитело к TIGIT конъюгированы с радионуклидом или выявляемой меткой и/или несут метку, описанную в данном документе, и/или где применяют иммуногистологический метод.

[00450] Подразумевается, что анализ уровня экспрессии белка CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) включает качественное или количественное измерение или оценку уровня белка CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или 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 CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) в первом биологическом образце и сравнить со стандартным уровнем белка CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), при этом стандарт берут, например, из второго биологического образца, полученного от индивидуума, не имеющего нарушения, или определяют путем усреднения уровней из популяции индивидуумов, не имеющих нарушения. Как будет понятно из уровня техники, после того, как станет известен «стандартный» уровень полипептида CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), его можно многократно применять в качестве стандарта для сравнения. Следовательно, в дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу анализа и/или выявления уровней белка CD96 и/или TIGIT *in vitro*, например, уровней белка CD96 и/или TIGIT человека, в биологическом образце, включающему качественное или количественное измерение или оценку уровня белка CD96 и/или TIGIT, например, белка CD96 и/или TIGIT человека, в биологическом образце иммуногистологическим методом.

[00451] Применяемый в данном документе термин «биологический образец» относится к любому биологическому образцу, полученному от субъекта, линии клеток, ткани или другого источника клеток, потенциально экспрессирующего CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака). Способы получения биоптатов ткани и биологических жидкостей из животных (например, людей или яванских макаков) хорошо известны из уровня техники. Биологические образцы включают мононуклеарные клетки

периферической крови (РВМС).

[00452] Полиспецифическую молекулу к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) или выделенное антитело к TIGIT, описанные в данном документе, можно использовать для прогностических, диагностических, мониторинговых и скрининговых вариантов применения, включая варианты применения *in vitro* и *in vivo*, хорошо известные и стандартные для специалиста 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 прогнозирования, 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 (HerceptTestTM, 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 CD96 и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для применения в качестве диагностического средства. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к полиспецифической молекуле к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) или к выделенному антителу к TIGIT и/или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для применения в способе прогнозирования, 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 полиспецифической молекулы к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) или выделенного антитела к TIGIT по настоящему изобретению для прогнозирования, 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

CD96 и/или TIGIT человека в биологическом образце субъекта *in vitro*.

[00453] В определенных вариантах осуществления полиспецифическую молекулу к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) или выделенное антитело к TIGIT можно применять в иммуногистохимическом анализе биоптатов. В определенных вариантах осуществления способ является способом *in vitro*. В другом варианте осуществления полиспецифическую молекулу к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) или выделенное антитело к TIGIT можно применять для выявления уровней CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) или уровней клеток, которые содержат CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) на поверхности своих мембран, уровни которых затем можно связать с определенными симптомами заболевания. Полиспецифические молекулы к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) и выделенные антитела к TIGIT, описанные в данном документе, могут нести выявляемую или функциональную метку и/или могут быть конъюгированы с радионуклидной 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. Полиспецифические молекулы к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) и выделенные антитела к TIGIT, описанные в данном документе, могут нести флуоресцентную метку или могут быть конъюгированы с ней. Иллюстративные флуоресцентные метки включают, например, реакционноспособные и конъюгированные зонды, например, аминокумарин, флуоресцеин и техасский красный, красители Alexa Fluor, красители Cy и красители DyLight. Полиспецифическая молекула к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) или выделенное антитело к TIGIT могут нести радиоактивную метку или радионуклид, например, 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 могут быть конъюгированы с ними. При применении радиоактивных меток для идентификации и количественного определения специфического связывания полиспецифической молекулы к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) или TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) или выделенного антитела к TIGIT с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) можно применять доступные в

настоящее время процедуры подсчета, известные из уровня техники. В случае, когда метка представляет собой фермент, выявление можно выполнять посредством любой из используемых в настоящее время колориметрических, спектрофотометрических, флуороспектрофотометрических, амперометрических или газометрических методик, известных из уровня техники. Это может быть достигнуто путем приведения в контакт образца или контрольного образца с полиспецифической молекулой к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) или выделенным антителом к TIGIT в условиях, которые обеспечивают образование комплекса между полиспецифической молекулой к CD96 и/или к TIGIT и CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) или антителом к TIGIT и TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака). Любые комплексы, образованные между полиспецифической молекулой к CD96 и/или к TIGIT и CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) или 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 полиспецифических молекул к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) и описанных в данном документе антител к TIGIT в отношении TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) полиспецифические молекулы можно применять для специфического выявления экспрессии CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) на поверхности клеток, и антитела к TIGIT можно применять для специфического выявления TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака). Полиспецифические молекулы к CD96 и/или к TIGIT, описанные в данном документе, также можно применять для очистки CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) посредством иммуноаффинной очистки. Описанные в данном документе антитела к TIGIT также можно применять для очистки TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) посредством иммуноаффинной очистки. В данный документ также включена аналитическая система, которая может быть получена в форме набора для тестирования, набора или комплекта компонентов для количественного анализа степени присутствия, например, CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), или комплексов CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака)/лиганда CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или 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 полиспецифических молекул и антител

[00454] В другом аспекте в данном документе предусмотрены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую полиспецифическую молекулу, или антитело, или их часть, описанные в данном документе, или их фрагмент (например, VL и/или VH и легкую цепь и/или тяжелую цепь), которые специфически связываются с антигеном CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или 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.

[00455] 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(молекулы) нуклеиновой кислоты, кодирующая описанное в данном документе антитело, является выделенной или очищенной.

[00456] В конкретных аспектах в данном документе предусмотрены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие полиспецифические молекулы и антитела, которые специфически связываются с полипептидом CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) и содержат аминокислотную последовательность, описанную в данном документе, а также полиспецифические молекулы и антитела, которые конкурируют с такими полиспецифическими молекулами и антителами за связывание с полипептидом CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака)

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

[00457] В определенных аспектах в данном документе предусмотрены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь или тяжелую цепь описанных в данном документе полиспецифической молекулы или антитела. Полинуклеотиды могут содержать нуклеотидные последовательности, кодирующие легкую цепь, содержащую FR и CDR VL из полиспецифических молекул или антител, описанных в данном документе (см., например, таблицу 1 и таблицу 2), или нуклеотидные последовательности, кодирующие тяжелую цепь, содержащую FR и CDR VH из полиспецифических молекул или антител, описанных в данном документе (см., например, таблицу 1 и таблицу 2). В определенных вариантах осуществления полинуклеотид кодирует VH, VL, тяжелую цепь и/или легкую цепь полиспецифической молекулы, описанной в данном документе. В другом варианте осуществления полинуклеотид кодирует первую VH и первую VL полиспецифической молекулы, описанной в данном документе. В другом варианте осуществления полинуклеотид кодирует вторую VH и вторую VL полиспецифической молекулы, описанной в данном документе. В другом варианте осуществления полинуклеотид кодирует первую тяжелую цепь и первую легкую цепь полиспецифической молекулы, описанной в данном документе. В другом варианте осуществления полинуклеотид кодирует вторую тяжелую цепь и вторую легкую цепь полиспецифической молекулы, описанной 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.

[00458] Также в данном документе предусмотрены полинуклеотиды, кодирующие полиспецифическую молекулу к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) или выделенное антитело к TIGIT, которые оптимизированы, например, путем оптимизации кодонов/РНК, замены гетерологичными сигнальными последовательностями и устранения элементов нестабильности мРНК. Способы получения оптимизированных нуклеиновых кислот, кодирующих полиспецифическую молекулу к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), или 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 полиспецифической молекулы к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), или 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 полиспецифической молекулы к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) или выделенного антитела к TIGIT, кодируемых полинуклеотидами, которые не были оптимизированы.

[00459] В определенных вариантах осуществления оптимизированную полинуклеотидную последовательность, кодирующую полиспецифическую молекулу к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), или выделенное антитело к TIGIT, описанные в данном документе, или их фрагмент (например, домен VL и/или домен VH) можно гибридизировать с антисмысловым (например, комплементарным) полинуклеотидом с неоптимизированной полинуклеотидной последовательностью, кодирующей полиспецифическую молекулу к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), или выделенное антитело к TIGIT, описанные в данном документе, или их фрагмент (например, домен VL и/или домен VH). В конкретных вариантах осуществления оптимизированная нуклеотидная последовательность, кодирующая полиспецифическую молекулу к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), или выделенное антитело к TIGIT, описанные в данном документе, или фрагмент гибридизируется в условиях высокой жесткости с антисмысловым полинуклеотидом с неоптимизированной полинуклеотидной последовательностью, кодирующей полиспецифическую молекулу к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), или выделенное антитело к TIGIT, описанные в данном документе, или их фрагмент. В конкретном варианте осуществления оптимизированная нуклеотидная последовательность, кодирующая полиспецифическую молекулу к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), или выделенное антитело к TIGIT, описанные в данном документе, или их фрагмент, гибридизируется в условиях высокой жесткости, промежуточной или более низкой жесткости с антисмысловым полинуклеотидом с неоптимизированной нуклеотидной последовательностью,

кодирующей полиспецифическую молекулу к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), или выделенное антитело к TIGIT, описанные в данном документе, или их фрагмент. Информация об условиях 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.

[00460] Полинуклеотиды можно получить и определить нуклеотидную последовательность полинуклеотидов любым способом, известным из уровня техники. Нуклеотидные последовательности, кодирующие описанные в данном документе полиспецифические молекулы и антитела, например, полиспецифические молекулы и антитела, описанные в таблице 1 и таблице 2, и модифицированные версии данных полиспецифических молекул и антител, можно определить с применением способов, хорошо известных из уровня техники, *m. e.* нуклеотидные кодоны, о которых известно, что они кодируют конкретные аминокислоты, собирают таким образом, чтобы получить нуклеиновую кислоту, которая кодирует полиспецифическую молекулу или антитело. Такой полинуклеотид, кодирующий полиспецифическую молекулу или антитело, можно собрать из химически синтезированных олигонуклеотидов (например, как описано в 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 полиспецифическую молекулу или антитело, отжиг и лигирование этих олигонуклеотидов, а затем амплификацию лигированных олигонуклеотидов посредством ПЦР.

[00461] В качестве альтернативы полинуклеотид, кодирующий антигенсвязывающую область описанной в данном документе полиспецифической молекулы или описанного в данном документе антитела, можно получить из нуклеиновой кислоты из подходящего источника (например, гибридомы) с применением способов, хорошо известных из уровня 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 полиспецифической молекулы или антитела. Такие способы ПЦР-амплификации можно применять для получения нуклеиновых кислот, содержащих последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи и/или переменную область тяжелой цепи полиспецифической молекулы или антитела. Амплифицированные нуклеиновые кислоты можно клонировать в векторы для экспрессии в клетках-хозяевах и для дальнейшего клонирования.

[00462] 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-A+ 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.

[00463] ДНК, кодирующую полиспецифические молекулы к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), или их антигенсвязывающие фрагменты, или выделенные антитела к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), описанные в данном документе, 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 антигенсвязывающей области к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), антигенсвязывающей области к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) или 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, которыми затем трансфицируют клетки-хозяева, такие как клетки *E. coli*, клетки COS обезьяны, клетки яичника китайского хомячка (CHO) (например, клетки CHO из CHO GS System™ (Lonza)) или клетки миеломы, которые в иных обстоятельствах не продуцируют белок-иммуноглобулин, для обеспечения синтеза полиспецифических молекул к CD96 и/или к TIGIT или антител к TIGIT в рекомбинантных клетках-хозяевах.

[00464] 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 неомицину. 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.

[00465] 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.

[00466] 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.

[00467] 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 6x растворе хлорида натрия/цитрата натрия (SSC) при приблизительно 45°C с последующей одной или более промывками в 0,2x SSC/0,1% SDS при приблизительно 50-65°C; гибридизация в очень жестких условиях может включать гибридизацию со связанной на фильтре нуклеиновой кислотой в 6x SSC при приблизительно 45°C с последующей одной или более промывками в 0,1x SSC/0,2% SDS при 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.

[00468] В определенных аспектах в данном документе предусмотрены клетки (например, клетки-хозяева), экспрессирующие (например, рекомбинантным путем) полиспецифические молекулы или их антигенсвязывающие области, описанные в данном документе, которые специфически связываются с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского

макака), клетки (например, клетки-хозяева), экспрессирующие (например, рекомбинантным путем) антитела, описанные в данном документе, 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, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие полиспецифические молекулы к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), или их антигенсвязывающие области, и 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 полиспецифических молекул к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) и антител к TIGIT, описанных в данном документе (например, человеческого или гуманизированного антитела). В конкретном аспекте в данном документе предусмотрены способы получения полиспецифической молекулы или антитела, описанных в данном документе, включающие экспрессию полиспецифической молекулы или ее антигенсвязывающих областей или антитела в клетке-хозяине.

[00469] Рекомбинантная экспрессия полиспецифической молекулы или ее антигенсвязывающей области или антитела, описанных в данном документе (например, полноразмерных антигенсвязывающей области или антитела или тяжелой и/или легкой цепей антитела, описанного в данном документе), которые специфически связываются с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), обычно предусматривает конструирование вектора экспрессии, содержащего полинуклеотид, который кодирует полиспецифическую молекулу или ее антигенсвязывающую область или антитело. После того как был получен полинуклеотид, кодирующий полиспецифическую молекулу или ее антигенсвязывающую область или молекулу антитела, тяжелую и/или легкую цепи полиспецифической молекулы или антитела или их фрагмент (например, переменные области тяжелых и/или легких цепей), описанные в данном документе, вектор для продуцирования полиспецифической молекулы или ее антигенсвязывающей области или молекулы антитела можно получить посредством технологии рекомбинантной ДНК с применением методик, хорошо известных из уровня техники. Таким образом, в данном документе описаны способы получения белка путем экспрессии полинуклеотида, содержащего нуклеотидную последовательность, кодирующую полиспецифическую молекулу или ее антигенсвязывающую область или 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 полиспецифическую молекулу или ее антигенсвязывающую область или 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 содержащую полиспецифическую молекулу или ее антигенсвязывающую область или молекулу антитела, описанные в данном документе, 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, содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую константную область полиспецифической молекулы или 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), и переменные области полиспецифической молекулы или антитела можно клонировать в такой вектор для экспрессии полноразмерной тяжелой, полноразмерной легкой цепи или обеих полноразмерных тяжелой и легкой цепей.

[00470] В определенных вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VH, VL, тяжелую цепь и/или легкую цепь полиспецифической молекулы, описанной в данном документе. В другом варианте осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий первую VH и первую VL полиспецифической молекулы, описанной в данном документе. В другом варианте осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий вторую VH и вторую VL полиспецифической молекулы, описанной в данном документе. В другом варианте осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий первую тяжелую цепь и первую легкую цепь полиспецифической молекулы, описанной в данном документе. В другом варианте осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий вторую тяжелую цепь и вторую легкую цепь полиспецифической молекулы, описанной в данном документе. В другом варианте осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VH и/или VL или тяжелую цепь и/или легкую цепь выделенного антитела, описанного в данном документе.

[00471] Вектор экспрессии можно перенести в клетку (например, клетку-хозяина) посредством традиционных методик, и полученные клетки затем можно культивировать посредством традиционных методик с получением продукта, содержащего описанные в данном документе полиспецифическую молекулу или ее антигенсвязывающую область или антитело или его фрагмент. Таким образом, в данном документе предусмотрены клетки-хозяева, содержащие полинуклеотид, кодирующий содержащий описанные в данном документе полиспецифическую молекулу или ее антигенсвязывающую область, или антитело или его фрагменты, или его тяжелую или легкую цепи, или их фрагмент, или описанное в данном документе одноцепочечное антитело, функционально связанный с промотором, для экспрессии таких последовательностей в клетке-хозяине.

[00472] В определенных вариантах осуществления клетка-хозяин содержит

тяжелую цепь второй антигенсвязывающей области полиспецифической молекулы, описанной в данном документе, и четвертый вектор, содержащий четвертый полинуклеотид, кодирующий легкую цепь второй антигенсвязывающей области полиспецифической молекулы, описанной в данном документе.

[00476] 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.

[00477] В конкретных вариантах осуществления тяжелая цепь/вариабельная область тяжелой цепи, экспрессируемая первой клеткой, связана с легкой цепью/вариабельной областью легкой цепи из второй клетки с образованием полиспецифической молекулы к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), описанной в данном документе, или ее антигенсвязывающей области или антитела к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), описанного в данном документе. В определенных вариантах осуществления в данном документе предусмотрена популяция клеток-хозяев, содержащая такую первую клетку-хозяина и такую вторую клетку-хозяина.

[00478] В определенных вариантах осуществления в данном документе предусмотрена популяция векторов, содержащая первый вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий легкую цепь/вариабельную область легкой цепи полиспецифической молекулы к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), описанной в данном документе, или ее антигенсвязывающую область, или антитело к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), описанное в данном документе, и второй вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь/вариабельную область тяжелой цепи полиспецифической молекулы к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), описанной в данном документе, или ее антигенсвязывающую область, или антитело к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), описанное в данном документе.

[00479] Для экспрессии полиспецифических молекул, описанных в данном документе, или их антигенсвязывающих областей или молекул антитела, описанных в

данном документе, можно применять различные системы хозяин-вектор экспрессии (см., например, патент США № 5807715, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Такие системы хозяин-экспрессия представляют собой среды-носители, с помощью которых могут быть получены и впоследствии очищены представляющие интерес кодирующие последовательности, а также представляют собой клетки, которые при трансформации или трансфекции соответствующими нуклеотидными кодирующими последовательностями способны экспрессировать полиспецифическую молекулу, описанную в данном документе, или ее антигенсвязывающую область или молекулу антитела, описанную в данном документе, *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 полиспецифических молекул или их антигенсвязывающих областей или кодирующие последовательности антител; дрожжи (например, *Saccharomyces* и *Pichia*) трансформированные, например, рекомбинантными векторами экспрессии для дрожжей, содержащими кодирующие последовательности антител; системы на основе клеток насекомых, инфицированные, например, рекомбинантными вирусными векторами экспрессии (например, бакуловирусом), содержащими кодирующие последовательности полиспецифических молекул или их антигенсвязывающие области или кодирующие последовательности антител; системы на основе растительных клеток (например, зеленых водорослей, таких 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 полиспецифических молекул или их антигенсвязывающих областей или кодирующие последовательности антител, 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 осповакцины). 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 полиспецифической молекулы, или ее антигенсвязывающая область, или антитело, продуцируемые клеткой CHO, могут содержать N-концевой остаток глутамина или глутамата, замененный пироглутаматом. В определенных вариантах осуществления клетки для экспрессии описанных в данном документе антител представляют собой клетки человека, например, линии клеток

человека. В конкретном варианте осуществления вектор экспрессии для клеток млекопитающего представляет собой pOptiVEC™ или pcDNA3.3. 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 цитомегаловируса человека (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 полиспецифические молекулы, описанные в данном документе, или их антигенсвязывающая область или антитела, описанные в данном документе, продуцируются клетками CHO или клетками NS0. В конкретном варианте осуществления экспрессия нуклеотидных последовательностей, кодирующих полиспецифические молекулы к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), описанные в данном документе, или их антигенсвязывающую область или антитела, описанные в данном документе, которые специфически связываются с TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), регулируется конститутивным промотором, индуцируемым промотором или тканеспецифическим промотором.

[00480] В бактериальных системах можно предпочтительно выбрать ряд векторов экспрессии в зависимости от предполагаемого применения экспрессируемой полиспецифической молекулы или молекулы антитела. Например, когда необходимо получение большого количества такой полиспецифической молекулы или антитела для получения фармацевтических композиций на основе полиспецифической молекулы или молекулы антитела, могут потребоваться векторы, которые управляют экспрессией высоких уровней продуктов, представляющих собой слитые белки, которые легко очистить. Такие векторы включают без ограничения вектор экспрессии pUR278 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 pIN (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 pGEX 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 pGEX 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.

[00481] В системе на основе клеток насекомых в качестве вектора для экспрессии чужеродных генов можно применять, например, вирус ядерного полиэдроза *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).

[00482] 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 элементов-энхансеров транскрипции, терминаторов транскрипции и т. п. (см., например, Bitter G *et al.*, (1987) Methods Enzymol. 153: 516-544, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

[00483] 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 миеломы мыши, 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 полиспецифические молекулы к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) или антитела к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), описанные в данном документе, получают в клетках млекопитающих, таких как клетки CHO.

[00484] В конкретном варианте осуществления полиспецифические молекулы или антитела, описанные в данном документе, характеризуются пониженным содержанием фукозы или не содержат фукозу. Такие полиспецифические молекулы или антитела можно получить с применением методик, известных специалисту в данной области техники. Например, полиспецифические молекулы или их антигенсвязывающие области или антитела можно экспрессировать в клетках с дефицитом способности к фукозилированию или отсутствием такой способности. В конкретном примере для получения полиспецифических молекул или их антигенсвязывающих областей или антител с пониженным содержанием фукозы можно применять линии клеток с нокаутом обоих аллелей α 1,6-фукозилтрансферазы. Примером такой системы, которую можно применять для получения антител со сниженным содержанием фукозы, является система Potelligent[®] (Lonza).

[00485] Для долгосрочного высокопродуктивного продуцирования рекомбинантных белков можно создать клетки со стабильной экспрессией. Например, можно сконструировать линии клеток, которые стабильно экспрессируют полиспецифическую молекулу к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) или ее антигенсвязывающую область или антитело к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), описанные в данном документе. 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.

[00486] 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. п.) и содержащей

селектируемый маркер. После введения чужеродной ДНК/полинуклеотида сконструированные клетки можно оставить расти в течение 1-2 дней в обогащенной среде, а затем перенести их на селективную среду. Селектируемый 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. Данный способ можно преимущественно применять для конструирования линий клеток, которые экспрессируют полиспецифическую молекулу к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) или ее антигенсвязывающую область или антитело к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), описанные в данном документе, или их фрагмент. Такие сконструированные линии клеток могут быть особенно применимы для скрининга и оценки композиций, которые непосредственно или опосредованно взаимодействуют с полиспецифической молекулой или молекулой антитела.

[00487] Можно применять множество 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-, hgppt- или aprt- клетках соответственно, все из которых 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 аминогликозиду 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), все из которых 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.

[00488] Уровни экспрессии полиспецифической молекулы или ее антигенсвязывающей области или молекулы антитела можно повысить путем

амплификации вектора (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 повышаться (Crouse GF *et al.*, (1983) Mol Cell Biol 3: 257-66, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

[00489] 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 селектируемые 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.

[00490] 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). Кодированные 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 больше 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.

[00491] После того как описанные в данном документе полиспецифическая молекула или ее антигенсвязывающая область или молекула антитела были получены путем рекомбинантной экспрессии, их можно очистить любым способом, известным из

уровня техники для очистки молекулы иммуноглобулина, например, посредством хроматографии (например, ионообменной, аффинной, в частности по аффинности к конкретному антигену после белка А, и эксклюзионной колоночной хроматографии), центрифугирования, дифференциальной растворимости или любой другой стандартной методики очистки белков. Кроме того, для облегчения очистки описанные в данном документе полиспецифические молекулы и антитела можно слить с гетерологичными полипептидными последовательностями, описанными в данном документе или иным образом известными из уровня техники.

[00492] В конкретных вариантах осуществления полиспецифическая молекула, описанная в данном документе, или ее антигенсвязывающая область или 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) гетерологичного 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.

[00493] Полиспецифические молекулы к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) или их антигенсвязывающие области, или антитела к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), или их фрагменты можно получить посредством любого способа, известного из уровня техники для синтеза белков или антител, например, путем химического синтеза или посредством 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.

[00494] В конкретном варианте осуществления полиспецифическую молекулу, описанную в данном документе, или ее антигенсвязывающую область или антитело, описанное в данном документе, получают, экспрессируют, создают или выделяют любыми способами, которые включают создание, например, посредством синтеза, генной инженерии последовательностей ДНК. В определенных вариантах осуществления такие полиспецифическая молекула или ее антигенсвязывающая область или антитело содержат последовательности (например, последовательности ДНК или аминокислотные последовательности), которые не существуют в природе в пределах репертуара антител зародышевой линии у животного или млекопитающего (например, человека) *in vivo*.

[00495] В одном аспекте в данном документе предусмотрен способ получения полиспецифической молекулы к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) или ее антигенсвязывающей области или антитела к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), включающий культивирование клетки или клетки-хозяина, описанных в данном документе. В определенных вариантах осуществления способ осуществляют *in vitro*. В определенном аспекте в данном документе предусмотрен способ получения полиспецифической молекулы к CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) или ее антигенсвязывающей области или антитела к TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака), включающий экспрессию (например, рекомбинантную экспрессию) полиспецифической молекулы или ее антигенсвязывающей области или антитела с применением клетки или клетки-хозяина, описанных в данном документе (например, клетки или клетки-хозяина, содержащих полинуклеотиды, кодирующие антитело,

описанное в данном документе). 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 полиспецифической молекулы или ее антигенсвязывающей области или антитела, полученных из клетки или клетки-хозяина.

[00496] В определенных вариантах осуществления полиспецифическую молекулу получают путем экспрессии в клетке первого полинуклеотида, кодирующего VH и VL первой антигенсвязывающей области полиспецифической молекулы, описанной в данном документе, и второго полинуклеотида, кодирующего VH и VL второй антигенсвязывающей области полиспецифической молекулы, описанной в данном документе, в подходящих условиях, так что экспрессируются полинуклеотиды и продуцируется полиспецифическая молекула. В определенных вариантах осуществления полиспецифическую молекулу получают путем экспрессии в клетке первого полинуклеотида, кодирующего тяжелую цепь и легкую цепь первой антигенсвязывающей области полиспецифической молекулы, описанной в данном документе, и второго полинуклеотида, кодирующего тяжелую цепь и легкую цепь второй антигенсвязывающей области полиспецифической молекулы, описанной в данном документе, в подходящих условиях, так что экспрессируются полинуклеотиды и продуцируется полиспецифическая молекула.

[00497] В определенных вариантах осуществления полиспецифическую молекулу получают путем экспрессии в клетке первого полинуклеотида, кодирующего VH первой антигенсвязывающей области полиспецифической молекулы, описанной в данном документе, второго полинуклеотида, кодирующего VL первой антигенсвязывающей области полиспецифической молекулы, описанной в данном документе, третьего полинуклеотида, кодирующего VH второй антигенсвязывающей области полиспецифической молекулы, описанной в данном документе, и четвертого полинуклеотида, кодирующего VL второй антигенсвязывающей области полиспецифической молекулы, описанной в данном документе, в подходящих условиях, так что экспрессируются полинуклеотиды и продуцируется полиспецифическая молекула. В определенных вариантах осуществления полиспецифическую молекулу получают путем экспрессии в клетке первого полинуклеотида, кодирующего тяжелую цепь первой антигенсвязывающей области полиспецифической молекулы, описанной в данном документе, второго полинуклеотида, кодирующего легкую цепь первой антигенсвязывающей области полиспецифической молекулы, описанной в данном документе, третьего полинуклеотида, кодирующего тяжелую цепь второй антигенсвязывающей области полиспецифической молекулы, описанной в данном документе, и четвертого полинуклеотида, кодирующего легкую цепь второй антигенсвязывающей области полиспецифической молекулы, описанной в данном документе, в подходящих условиях, так что экспрессируются полинуклеотиды и продуцируется полиспецифическая молекула.

[00498] В определенных вариантах осуществления полиспецифическую молекулу получают путем приведения в контакт первой антигенсвязывающей области и второй антигенсвязывающей области полиспецифической молекулы, описанной в данном документе, в условиях, обеспечивающих продуцирование полиспецифической молекулы. Например, в определенных вариантах осуществления полиспецифическую молекулу получают путем экспрессии в первой клетке первого полинуклеотида, кодирующего VH и VL первой антигенсвязывающей области полиспецифической молекулы, описанной в данном документе, в условиях, при которых продуцируется первая антигенсвязывающая область, и экспрессии во второй клетке второго полинуклеотида, кодирующего VH и VL второй антигенсвязывающей области полиспецифической молекулы, описанной в данном документе, в условиях, при которых продуцируется вторая антигенсвязывающая область, и приведения в контакт первой и второй антигенсвязывающих областей в подходящих условиях, так что продуцируется полиспецифическая молекула. В качестве альтернативы в определенных вариантах осуществления полиспецифическую молекулу получают путем экспрессии в первой клетке первого полинуклеотида, кодирующего VH первой антигенсвязывающей области полиспецифической молекулы, описанной в данном документе, и второго полинуклеотида, кодирующего VL первой антигенсвязывающей области полиспецифической молекулы, описанной в данном документе, в условиях, при которых продуцируется первая антигенсвязывающая область, и экспрессии во второй клетке третьего полинуклеотида, кодирующего VH второй антигенсвязывающей области полиспецифической молекулы, описанной в данном документе, и четвертого полинуклеотида, кодирующего VL второй антигенсвязывающей области полиспецифической молекулы, описанной в данном документе, в условиях, при которых продуцируется вторая антигенсвязывающая область, и приведения в контакт первой и второй антигенсвязывающих областей в подходящих условиях, так что продуцируется полиспецифическая молекула. Подходящие методики и условия приведения в контакт первой и второй антигенсвязывающих областей с получением полиспецифической молекулы включают без ограничения методики и условия, описанные в WO 2011/131746, WO 2011/147986, WO 2008/119353 и WO 2013/060867 и в Labrijn AF *et al.*, (2013) PNAS 110(13): 5145-5150, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00499] 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 VH 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.

[00500] 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).

[00501] Моноклональные антитела можно получить с применением широкого спектра методик, известных из уровня техники, включая применение гибридомы, рекомбинантных методик и методик фагового дисплея или их комбинации. Например, моноклональные антитела можно получить с применением гибридомных методик, в том числе известных из уровня 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.*, in: *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.

[00502] В конкретных вариантах осуществления термин «моноклональное антитело», применяемый в данном документе, обозначает антитело, продуцируемое одной клеткой (например, гибридомой или клеткой-хозяином, продуцирующей рекомбинантное антитело), где антитело специфически связывается с CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака), как определено, например, посредством ELISA или другого анализа связывания антигена или конкурентного связывания, известного из уровня техники или описанного в предусмотренных в данном документе примерах. В определенных вариантах осуществления моноклональное антитело может представлять собой химерное антитело или гуманизованное антитело. 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*).

[00503] 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.

[00504] Способы получения и скрининга специфических антител с применением гибридной технологии являются традиционными и хорошо известны в данной области техники. Например, в гибридном способе мышь или другое подходящее животное-хозяина, такое как овца, коза, кролик, крыса, хомяк или макак, иммунизируют для индуцирования лимфоцитов, которые продуцируют или способны продуцировать антитела, которые будут специфически связываться с белком (например, CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака)), применяемым для иммунизации. В качестве альтернативы лимфоциты можно иммунизировать *in vitro*. Затем лимфоциты сливают с клетками миеломы с применением подходящего средства для слияния, такого как полиэтиленгликоль, с образованием гибридной 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, включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

[00505] В определенных вариантах осуществления мышей (или других животных, таких как крысы, обезьяны, ослы, свиньи, овцы, хомяки или собаки) можно иммунизировать антигеном (например, CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака)), а после выявления иммунного ответа, например, выработки специфических к антигену антител в мышинной сыворотке крови, собирают мышиную селезенку и выделяют спленоциты. Затем спленоциты 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.

[00506] Полученные таким образом гибридные 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.

[00507] 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).

[00508] Культуральную среду, в которой растут гибридомные клетки, анализируют в отношении продуцирования моноклональных антител, направленных против TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака). Специфичность связывания моноклональных антител, продуцируемых клетками гибридомы, определяют способами, известными из уровня техники, например, посредством иммунопреципитации или анализа связывания *in vitro*, такого как радиоиммуноанализ (RIA) или твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA).

[00509] После идентификации гибридомных 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, гибридомные клетки можно выращивать в условиях *in vivo* в виде асцитных опухолей у животного.

[00510] 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.

[00511] 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.

[00512] 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, обычно представляет собой нитевидный фаг, в том числе fd и M13, а домены VH и VL обычно рекомбинантно сливают либо с геном III, либо с геном 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.

[00513] 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.

[00514] 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.

[00515] Химерное антитело представляет собой молекулу, в которой разные части антитела получены из разных молекул иммуноглобулина. Например, химерное антитело может содержать переменную область мышиного 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.

[00516] 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, мышиного 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 из уровня техники, включая без ограничения прививание CDR (европейский патент № EP 239400; международная публикация № WO 91/09967 и патенты США №№ 5225539, 5530101 и 5585089), винирование 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; Baca 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.

[00517] Были описаны способы получения полиспецифических молекул и 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.

[00518] 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.

[00519] Полиспецифическую молекулу или биспецифическое антитело, описанные 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 в 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, то полученный гетеродимер представляет собой полиспецифическую молекулу или биспецифическое антитело.

[00520] Для технологии DuoBody требуется, чтобы каждое из моноспецифических антител или антигенсвязывающих областей включало константную область тяжелой цепи с единственной точечной мутацией в домене СНЗ. Точечные мутации обеспечивают более сильное взаимодействие между доменами СНЗ в полученном биспецифическом антителе, чем между доменами СНЗ 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 или полиспецифическая молекула, полученные посредством технологии DuoBody, могут сохранять Fc-опосредованные эффекторные функции.

[00521] Другой способ получения полиспецифических молекул или 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 СН3 были модифицированы путем мутации выбранных аминокислот, которые взаимодействуют на поверхности контакта между двумя полипептидами, так что преимущественно образуется биспецифическое антитело. Биспецифические антитела или полиспецифические молекулы 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).

[00522] В некоторых случаях полиспецифические молекулы, которые связываются с CD96 и/или TIGIT, 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 СН3 в IgG₄ и IgG₁ или IgG₃ человека, чтобы таким образом способствовать образованию гетеродимерной тяжелой цепи.

[00523] 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 вариабельную 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 гибридной технологии. Трансгены человеческого иммуноглобулина, содержащиеся в трансгенных мышах, 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.

[00524] 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.

[00525] В определенных вариантах осуществления человеческие антитела можно получить с применением гибридом мыши и человека. Например, человеческие лимфоциты периферической крови, трансформированные вирусом Эпштейна-Барр (EBV), можно слить с клетками мышинной миеломы с получением гибридом мыши и человека, секретирующих 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

[00526] Также предусмотрены наборы, содержащие одну или более полиспецифических молекул или антител, описанных в данном документе, или

фармацевтические композиции на их основе или их конъюгаты. В конкретном варианте осуществления в данном документе предусмотрены фармацевтическая упаковка или набор, содержащие один или более контейнеров, заполненных одним или более ингредиентами описанных в данном документе фармацевтических композиций, такими как одна или более полиспецифических молекул или 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 (РНА) и/или форболмиристатацетат (РМА), или антитело, стимулирующее комплекс ТСR, такое как антитело к CD3 и антитело к CD28. Необязательно с таким контейнером(контейнерами) 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.

[00527] Также предусмотрены наборы, которые можно применять в вышеуказанных способах. В определенных вариантах осуществления набор содержит описанное в данном документе антитело, предпочтительно полиспецифическую молекулу или очищенное антитело, в одном или более контейнерах. В конкретном варианте осуществления наборы, описанные в данном документе, содержат по сути выделенный антиген CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или антиген TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) в качестве контроля. В другом конкретном варианте осуществления наборы, описанные в данном документе, дополнительно содержат контрольное антитело, которое не взаимодействует с антигеном CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или антигеном 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 полиспецифической молекулы или антитела с антигеном CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или антигеном TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) (например, полиспецифическая молекула или антитело могут быть конъюгированы 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 набор, предусмотренный в данном документе, может содержать рекомбинантно полученный или химически синтезированный антиген CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или антиген TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака). Предусмотренный в наборе антиген CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского

макака) и/или антиген TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) также может быть присоединен к твердой подложке. В более конкретном варианте осуществления средства выявления из набора, описанного выше, включают твердую подложку, к которой присоединен антиген CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или антиген TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака). Такой набор также может содержать неприсоединенное меченное репортерной меткой антитело к человеческому антителу или антитело к антителу мыши/крысы. В данном варианте осуществления связывание полиспецифической молекулы или антитела с антигеном CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или антигеном TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) можно выявлять посредством связывания указанного меченного репортерной меткой антитела. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению набора по настоящему изобретению для анализа *in vitro* и/или выявления антигена CD96 (например, CD96 человека или CD96 яванского макака) и/или антигена TIGIT (например, TIGIT человека или TIGIT яванского макака) в биологическом образце.

8. ПРИМЕРЫ

[00528] Примеры в данном разделе (т. е. в разделе б) предложены в качестве иллюстрации, а не в качестве ограничения.

[00529] В таблице 5 представлены подробности для различных полиспецифических молекул и моноспецифических антител, используемых в следующих примерах.

Таблица 5. Иллюстративные полиспецифические молекулы и моноспецифические антитела.

Описание	Область связывания антигена CD96		Область связывания антигена TIGIT	
	SEQ ID NO		SEQ ID NO	
	HC	LC	HC	LC
BA123	1	2	7	9
BA125	3	4	7	9
BA127	5	6	7	9
BA128	Изотипический контроль		Изотипический контроль	
BA129	1	2	Изотипический контроль	
BA130	3	4	Изотипический контроль	
BA131	5	6	Изотипический контроль	
BA133	Изотипический контроль		7	9
BA134	Эталонное антитело к CD96		Изотипический контроль	
BA136	Эталонное антитело к CD96		7	9
BA143	47	6	N/A	N/A

BA144	46	4	N/A	N/A
BA145	45	2	N/A	N/A
BA146	Изотипический контроль		N/A	N/A
BA148	N/A	N/A	48	9
BA149	N/A	N/A	Изотипический контроль	

8.1 Пример 1. Определение характеристик полиспецифических молекул к TIGITxCD96

8.1.1 Полиспецифические молекулы к TIGITxCD96 связываются с очищенным белком CD96 человека и яванского макака

Связывание с His-меченной изоформой 2 CD96 человека с мутацией C89S

[00530] Аффинность связывания полиспецифических молекул BA123, BA125 и BA127 с вариантом полноразмерного внеклеточного домена (ECD) изоформы 2 CD96 человека, содержащего мутацию C89S (SEQ ID NO: 63), оценивали посредством поверхностного плазмонного резонанса.

[00531] Вкратце, эксперименты с поверхностным плазмонным резонансом проводили с применением прибора Biacore T200 и по результатам каждого эксперимента рассчитывали скорость ассоциации (k_a), скорость диссоциации (k_d) и константу диссоциации (K_D) с применением модели связывания 1:1 с помощью программного обеспечения для оценивания Biacore T200.

[00532] Примерно 2 мкг/мл BA123, BA125 и BA127, разбавленных буфером для анализа (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA и 0,05% поверхностно-активного вещества P20), захватывали в отдельных проточных ячейках сенсорного чипа с белком А серии S (GE Healthcare Ltd, № по кат. 29-1275-56), оставив одну проточную ячейку в качестве эталона. Полиспецифические молекулы захватывали с применением 30-секундной инъекции с расходом 10 мкл/мин до достижения приблизительно 350 резонансных единиц (RU). Полноразмерную изоформу 2 ECD CD96 человека с мутацией C89S (SEQ ID NO: 63) разбавляли до концентрации 0, 0,41, 1,23, 3,7, 11,1, 33,3 и 100 нМ и пропускали по поверхности чипа при расходе 30 мкл/мин с 3-минутной фазой ассоциации и 10-минутной фазой диссоциации. Между циклами сенсорный чип регенерировали посредством двух 30-секундных инъекций 10 mM глицина, pH 1,5. Сенсограммы оценивали и аппроксимировали к простой модели взаимодействия Ленгмюра 1:1 с использованием опции глобального анализа данных программного обеспечения VIAevaluation 3.0. Качество данных проверяли посредством визуального инспектирования отклонений и аппроксимации кривой, а также путем оценки параметров R_{max} , χ^2 и T_c . Кинетику связывания (k_a , k_d и K_D) определяли по результатам анализов сенсограмм, и результаты показаны в таблице 6.

Таблица 6. Кинетические параметры связывания полиспецифических молекул к TIGITxCD96 с полноразмерной изоформой 2 ECD CD96 человека с мутацией C89S (SEQ ID NO: 63).

Полиспецифическая молекула	Эксперимент №1			Эксперимент №2			Среднее геометрическое значение K_D
	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	
BA123	1,58E+04	1,25E-03	7,90E-08	9,76E+0 3	8,30E- 04	8,50E- 08	81,9 нМ
BA125	6,51E+05	1,81E-02	2,78E-08	4,38E+0 5	7,96E- 03	1,82E- 08	22,5 нМ
BA127	5,92E+04	1,16E-03	1,96E-08	4,05E+0 4	7,96E- 04	1,97E- 08	19,6 нМ

Связывание с His-меченной изоформой 2 CD96 яванского макака

[00533] Аффинность связывания полиспецифических молекул BA123, BA125 и BA127 с полноразмерным ECD изоформы 2 CD96 яванского макака (SEQ ID NO: 111) оценивали посредством поверхностного плазмонного резонанса.

[00534] Вкратце, эксперименты с поверхностным плазмонным резонансом проводили с применением прибора Biacore T200 и по результатам каждого эксперимента рассчитывали скорость ассоциации (k_a), скорость диссоциации (k_d) и константу диссоциации (K_D) с применением модели связывания 1:1 с помощью программного обеспечения для оценивания Biacore T200.

[00535] Примерно 2 мкг/мл BA123, BA125 и BA127, разбавленных буфером для анализа (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA и 0,05% поверхностно-активного вещества P20), захватывали в отдельных проточных ячейках сенсорного чипа с белком А серии S (GE Healthcare Ltd, № по кат. 29-1275-56), оставив одну проточную ячейку в качестве эталона. Полиспецифические молекулы захватывали с применением 30-секундной инъекции с расходом 10 мкл/мин до достижения приблизительно 350 резонансных единиц (RU). Полноразмерную изоформу 2 ECD CD96 яванского макака (SEQ ID NO: 111) разбавляли до концентрации 0, 0,41, 1,23, 3,7, 11,1, 33,3 и 100 нМ и пропускали по поверхности чипа при расходе 30 мкл/мин с 3-минутной фазой ассоциации и 10-минутной фазой диссоциации. Между циклами сенсорный чип регенерировали посредством двух 30-секундных инъекций 10 mM глицина, pH 1,5. Сенсограммы оценивали и аппроксимировали к простой модели взаимодействия Ленгмюра 1:1 с использованием опции глобального анализа данных программного обеспечения VIAevaluation 3.0. Качество данных проверяли посредством визуального инспектирования отклонений и аппроксимации кривой, а также путем оценки параметров R_{max} , Chi2 и Tc. Кинетику связывания (k_a , k_d и K_D) определяли по результатам анализов сенсограмм, и результаты показаны в таблице 7.

Таблица 7. Кинетические параметры связывания полиспецифических молекул к TIGITxCD96 с полноразмерной изоформой 2 ECD CD96 яванского макака (SEQ ID NO: 111).

Полиспецифическая молекула	Эксперимент №1			Эксперимент №2			Среднее геометрическое значение K_D
	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	
BA123	7,90E+0 4	3,79E-03	4,80E-08	7,59E+0 4	3,24E- 03	4,27E- 08	45,3 нМ
BA125	Значительное связывание отсутствует			Значительное связывание отсутствует			-
BA127	Значительное связывание отсутствует			Значительное связывание отсутствует			-

8.1.2 Связывание полиспецифических молекул к TIGITxCD96 с очищенным белком TIGIT человека и яванского макака

Связывание с His-меченым TIGIT человека

[00536] Аффинность связывания полиспецифических молекул BA123, BA125 и BA127 с полноразмерным ECD TIGIT человека (SEQ ID NO: 113) оценивали посредством поверхностного плазмонного резонанса.

[00537] Вкратце, эксперименты с поверхностным плазмонным резонансом проводили с применением прибора Biacore T200 и по результатам каждого эксперимента рассчитывали скорость ассоциации (k_a), скорость диссоциации (k_d) и константу диссоциации (K_D) с применением модели связывания 1:1 с помощью программного обеспечения для оценивания Biacore T200.

[00538] Примерно 4 мкг/мл BA123, BA125 и BA127, разбавленных буфером для анализа (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA и 0,05% поверхностно-активного вещества P20), захватывали в отдельных проточных ячейках сенсорного чипа с белком А серии S (GE Healthcare Ltd, № по кат. 29-1275-56), оставив одну проточную ячейку в качестве эталона. Полиспецифические молекулы захватывали с применением 30-секундной инъекции с расходом 10 мкл/мин до достижения приблизительно 1000 резонансных единиц (RU). Полноразмерный ECD TIGIT человека (SEQ ID NO: 113) разбавляли до концентрации 0, 0,41, 1,23, 3,7, 11,1, 33,3 и 100 нМ и пропускали по поверхности чипа при расходе 30 мкл/мин с 3-минутной фазой ассоциации и 10-минутной фазой диссоциации. Между циклами сенсорный чип регенерировали посредством двух 30-секундных инъекций 10 mM глицина, pH 1,5. Сенсограммы оценивали и аппроксимировали к простой модели взаимодействия Ленгмюра 1:1 с использованием опции глобального анализа данных программного обеспечения VIAevaluation 3.0.

Качество данных проверяли посредством визуального инспектирования отклонений и аппроксимации кривой, а также путем оценки параметров R_{max} , Chi^2 и T_c . Кинетику связывания (k_a , k_d и K_D) определяли по результатам анализов сенсограмм, и результаты показаны в таблице 8.

Таблица 8. Кинетические параметры связывания полиспецифических молекул к TIGITxCD96 с полноразмерным ECD TIGIT человека (SEQ ID NO: 113).

Полиспецифическая молекула	Эксперимент №1			Эксперимент №2			Среднее геометрическое значение K_D
	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	
BA123	6,02E+0 5	4,44E-04	7,37E-10	6,60E+0 5	4,87E-04	7,37E-10	0,74 нМ
BA125	5,86E+0 5	3,67E-04	6,26E-10	6,00E+0 5	3,99E-04	6,65E-10	0,64 нМ
BA127	6,10E+0 5	3,56E-04	5,84E-10	6,31E+0 5	3,85E-04	6,11E-10	0,59 нМ

Связывание с His-меченым TIGIT яванского макака

[00539] Аффинность связывания полиспецифической молекулы BA123, BA125 и BA127 с полноразмерным ECD TIGIT яванского макака (SEQ ID NO: 114) оценивали посредством поверхностного плазмонного резонанса.

[00540] Вкратце, эксперименты с поверхностным плазмонным резонансом проводили с применением прибора Biacore T200 и по результатам каждого эксперимента рассчитывали скорость ассоциации (k_a), скорость диссоциации (k_d) и константу диссоциации (K_D) с применением модели связывания 1:1 с помощью программного обеспечения для оценивания Biacore T200.

[00541] Примерно 4 мкг/мл BA123, BA125 и BA127, разбавленных буфером для анализа (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA и 0,05% поверхностно-активного вещества P20), захватывали в отдельных проточных ячейках сенсорного чипа с белком А серии S (GE Healthcare Ltd, № по кат. 29-1275-56), оставив одну проточную ячейку в качестве эталона. Полиспецифические молекулы захватывали с применением 30-секундной инъекции с расходом 10 мкл/мин до достижения приблизительно 350 резонансных единиц (RU). Полноразмерный ECD TIGIT яванского макака (SEQ ID NO: 114) разбавляли до концентрации 0, 0,41, 1,23, 3,7, 11,1, 33,3 и 100 нМ и пропускали по поверхности чипа при расходе 30 мкл/мин с 3-минутной фазой ассоциации и 10-минутной фазой диссоциации. Между циклами сенсорный чип регенерировали посредством двух 30-секундных инъекций 10 mM глицина, pH 1,5. Сенсограммы оценивали и аппроксимировали к простой модели взаимодействия Ленгмюра 1:1 с использованием

опции глобального анализа данных программного обеспечения VIAevaluation 3.0. Качество данных проверяли посредством визуального инспектирования отклонений и аппроксимации кривой, а также путем оценки параметров R_{max} , Chi^2 и T_c . Кинетику связывания (k_a , k_d и K_D) определяли по результатам анализов сенсограмм, и результаты показаны в таблице 9.

Таблица 9. Кинетические параметры связывания полиспецифических молекул к TIGITxCD96 с полноразмерным ECD TIGIT яванского макака (SEQ ID NO: 114).

Полиспецифическая молекула	Эксперимент №1			Эксперимент №2			Среднее геометрическое значение K_D
	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	
BA123	2,77E+05	1,32E-03	4,78E-09	3,15E+05	1,35E-03	4,27E-09	4,5 нМ
BA125	2,92E+05	1,29E-03	4,43E-09	3,37E+05	1,31E-03	3,89E-09	4,2 нМ
BA127	2,94E+05	1,26E-03	4,29E-09	3,48E+05	1,29E-03	3,70E-09	4,0 нМ

8.2 Пример 2. Связывание антител к CD96 с очищенным белком CD96 человека и яванского макака

Связывание с His-меченой изоформой 2 CD96 человека с мутацией C89S

[00542] Аффинность связывания моноспецифических антител BA143, BA144 и BA145 с полноразмерным ECD изоформы 2 CD96 человека с мутацией C89S (SEQ ID NO: 63) оценивали посредством поверхностного плазмонного резонанса.

[00543] Вкратце, эксперименты с поверхностным плазмонным резонансом проводили с применением прибора Biacore T200 и по результатам каждого эксперимента рассчитывали скорость ассоциации (k_a), скорость диссоциации (k_d) и константу диссоциации (K_D) с применением модели связывания 1:1 с помощью программного обеспечения для оценивания Biacore T200.

[00544] Примерно 1 мкг/мл BA143, BA144 и BA145, разбавленных буфером для анализа (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA и 0,05% поверхностно-активного вещества P20), захватывали в отдельных проточных ячейках сенсорного чипа с белком А серии S (GE Healthcare Ltd, № по кат. 29-1275-56), оставив одну проточную ячейку в качестве эталона. Антитела захватывали с применением 30-секундной инъекции с расходом 10 мкл/мин до достижения приблизительно 175 резонансных единиц (RU). Полноразмерную изоформу 2 ECD CD96 человека с мутацией C89S (SEQ ID NO: 63)

разбавляли до концентрации 0, 0,41, 1,23, 3,7, 11,1, 33,3 и 100 нМ, пропускали по поверхности чипа при расходе 30 мкл/мин с 3-минутной фазой ассоциации и 10-минутной фазой диссоциации. Между циклами сенсорный чип регенерировали посредством двух 30-секундных инъекций 10 мМ глицина, pH 1,5. Сенсограммы оценивали и аппроксимировали к простой модели взаимодействия Ленгмюра 1:1 с использованием опции глобального анализа данных программного обеспечения VIAevaluation 3.0. Качество данных проверяли посредством визуального инспектирования отклонений и аппроксимации кривой, а также путем оценки параметров R_{max} , χ^2 и T_c . Кинетику связывания (k_a , k_d и K_D) определяли по результатам анализов сенсограмм, и результаты показаны в таблице 10.

Таблица 10. Кинетические параметры связывания антител к CD96 с полноразмерной изоформой 2 CD96 человека с мутацией C89S (SEQ ID NO: 63).

Полиспецифическая молекула	Эксперимент №1			Эксперимент №2			Среднее геометрическое значение K_D
	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	
BA143	4,40E+0 4	5,83E-04	1,33E-08	4,31E+0 4	5,72E-04	1,33E-08	13,3 нМ
BA144	1,19E+0 5	2,95E-03	2,48E-08	1,28E+0 5	3,02E-03	2,36E-08	24,2 нМ
BA145	1,18E+0 4	1,05E-03	8,91E-08	1,26E+0 4	9,07E-04	7,18E-08	80,0 нМ

Связывание с His-меченной изоформой 2 CD96 яванского макака

[00545] Аффинность связывания моноспецифических антител BA143, BA144 и BA145 с полноразмерным ECD изоформы 2 CD96 яванского макака (SEQ ID NO: 111) оценивали посредством поверхностного плазмонного резонанса.

[00546] Вкратце, эксперименты с поверхностным плазмонным резонансом проводили с применением прибора Biacore T200 и по результатам каждого эксперимента рассчитывали скорость ассоциации (k_a), скорость диссоциации (k_d) и константу диссоциации (K_D) с применением модели связывания 1:1 с помощью программного обеспечения для оценивания Biacore T200.

[00547] Примерно 1 мкг/мл BA143, BA144 и BA145, разбавленных буфером для анализа (10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 3 мМ EDTA и 0,05% поверхностно-активного вещества P20), захватывали в отдельных проточных ячейках сенсорного чипа с белком А серии S (GE Healthcare Ltd, № по кат. 29-1275-56), оставив одну проточную ячейку в качестве эталона. Антитела захватывали с применением 30-секундной инъекции с расходом 10 мкл/мин до достижения приблизительно 175 резонансных единиц (RU).

Полноразмерную изоформу 2 ECD CD96 яванского макака (SEQ ID NO: 111) разбавляли до концентрации 0, 0,41, 1,23, 3,7, 11,1, 33,3 и 100 нМ и пропускали по поверхности чипа при расходе 30 мкл/мин с 3-минутной фазой ассоциации и 10-минутной фазой диссоциации. Между циклами сенсорный чип регенерировали посредством двух 30-секундных инъекций 10 мМ глицина, рН 1,5. Сенсограммы оценивали и аппроксимировали к простой модели взаимодействия Ленгмюра 1:1 с использованием опции глобального анализа данных программного обеспечения BIAevaluation 3.0. Качество данных проверяли посредством визуального инспектирования отклонений и аппроксимации кривой, а также путем оценки параметров R_{max} , χ^2 и T_c . Кинетику связывания (k_a , k_d и K_D) определяли по результатам анализов сенсограмм, и результаты показаны в таблице 11.

Таблица 11. Кинетические параметры связывания антител к CD96 с полноразмерной изоформой 2 ECD CD96 яванского макака (SEQ ID NO: 111).

Антитело	Эксперимент №1			Эксперимент №2			Среднее геометрическое значение K_D
	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	
BA143	Значительное связывание отсутствует			Значительное связывание отсутствует			-
BA144	Значительное связывание отсутствует			Значительное связывание отсутствует			-
BA145	6,68E04	6,16E-03	9,23E-08	7,26E+04	5,84E-03	8,05E-08	86,2 нМ

8.3 Пример 3. Связывание антител к TIGIT с очищенным белком TIGIT человека и яванского макака

Связывание с His-меченым TIGIT человека

[00548] Аффинность связывания моноспецифического антитела BA148 с полноразмерным ECD TIGIT человека (SEQ ID NO: 113) оценивали посредством поверхностного плазмонного резонанса.

[00549] Вкратце, эксперименты с поверхностным плазмонным резонансом проводили с применением прибора Biacore T200 и по результатам каждого эксперимента рассчитывали скорость ассоциации (k_a), скорость диссоциации (k_d) и константу диссоциации (K_D) с применением модели связывания 1:1 с помощью программного обеспечения для оценивания Biacore T200.

[00550] Примерно 2 мкг/мл BA148, разбавленного буфером для анализа (10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 3 мМ EDTA и 0,05% поверхностно-активного вещества P20), захватывали в отдельных проточных ячейках сенсорного чипа с белком А серии S (GE

Healthcare Ltd, № по кат. 29-1275-56), оставив одну проточную ячейку в качестве эталона. Антитела захватывали с применением 30-секундной инъекции с расходом 10 мкл/мин до достижения приблизительно 500 резонансных единиц (RU). Полноразмерный ECD TIGIT человека (SEQ ID NO: 113) разбавляли до концентрации 0, 0,41, 1,23, 3,7, 11,1, 33,3 и 100 нМ и пропускали по поверхности чипа при расходе 30 мкл/мин с 3-минутной фазой ассоциации и 10-минутной фазой диссоциации. Между циклами сенсорный чип регенерировали посредством двух 30-секундных инъекций 10 мМ глицина, pH 1,5. Сенсограммы оценивали и аппроксимировали к простой модели взаимодействия Ленгмюра 1:1 с использованием опции глобального анализа данных программного обеспечения BIAevaluation 3.0. Качество данных проверяли посредством визуального инспектирования отклонений и аппроксимации кривой, а также путем оценки параметров R_{max} , χ^2 и T_c . Кинетику связывания (k_a , k_d и K_D) определяли по результатам анализов сенсограмм, и результаты показаны в таблице 12.

Таблица 12. Кинетические параметры связывания антител к TIGIT с полноразмерным ECD TIGIT человека (SEQ ID NO: 113).

Антитело	Эксперимент №1			Эксперимент №2			Среднее геометрическое значение K_D
	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	
BA148	7,73E+05	4,13E-04	5,35E-10	7,70E+05	4,22E-04	5,48E-10	0,54 нМ

Связывание с His-меченым TIGIT яванского макака

[00551] Аффинность связывания моноспецифического антитела BA148 с полноразмерным ECD TIGIT яванского макака (SEQ ID NO: 114) оценивали посредством поверхностного плазмонного резонанса.

[00552] Вкратце, эксперименты с поверхностным плазмонным резонансом проводили с применением прибора Biacore T200 и по результатам каждого эксперимента рассчитывали скорость ассоциации (k_a), скорость диссоциации (k_d) и константу диссоциации (K_D) с применением модели связывания 1:1 с помощью программного обеспечения для оценивания Biacore T200.

[00553] Примерно 4 мкг/мл BA148, разбавленного буфером для анализа (10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 3 мМ EDTA и 0,05% поверхностно-активного вещества P20), захватывали в отдельных проточных ячейках сенсорного чипа с белком А серии S (GE Healthcare Ltd, № по кат. 29-1275-56), оставив одну проточную ячейку в качестве эталона. Антитела захватывали с применением 30-секундной инъекции с расходом 10 мкл/мин до достижения приблизительно 500 резонансных единиц (RU). Полноразмерный ECD TIGIT яванского макака (SEQ ID NO: 114) разбавляли до концентрации 0, 0,41, 1,23, 3,7, 11,1, 33,3 и 100 нМ, пропускали по поверхности чипа при расходе 30 мкл/мин с 3-минутной

фазой ассоциации и 10-минутной фазой диссоциации. Между циклами сенсорный чип регенерировали посредством двух 30-секундных инъекций 10 мМ глицина, pH 1,5. Сенсограммы оценивали и аппроксимировали к простой модели взаимодействия Ленгмюра 1:1 с использованием опции глобального анализа данных программного обеспечения VIAevaluation 3.0. Качество данных проверяли посредством визуального инспектирования отклонений и аппроксимации кривой, а также путем оценки параметров R_{max} , $Chi2$ и Tc . Кинетику связывания (k_a , k_d и K_D) определяли по результатам анализов сенсограмм, и результаты показаны в таблице 13.

Таблица 13. Кинетические параметры связывания антител к TIGIT с полноразмерным ECD TIGIT яванского макака (SEQ ID NO: 114).

Антитело	Эксперимент №1			Эксперимент №2			Среднее геометрическое значение K_D
	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	
BA148	3,34E+05	1,27E-03	3,80E-09	3,10E+05	1,26E-03	4,06E-09	3,9 нМ

8.4 Пример 4. Одновременное двойное связывание очищенных белков TIGIT и CD96 человека с полиспецифическими молекулами к TIGITxCD96

Анализ связывания посредством поверхностного плазмонного резонанса

[00554] Способность полиспецифических молекул BA123, BA125 и BA127 одновременно связываться с полноразмерным ECD TIGIT человека (SEQ ID NO: 113) и полноразмерным ECD изоформы 2 CD96 человека с мутацией C89S (SEQ ID NO: 63) подтверждали с применением поверхностного плазмонного резонанса.

[00555] Вкратце, эксперименты с поверхностным плазмонным резонансом проводили с применением прибора Biacore T200 и сенсограммы визуально инспектировали с применением программного обеспечения для оценки Biacore T200.

[00556] Примерно 4 мкг/мл BA123, BA125 и BA127, разбавленных буфером для анализа (10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 3 мМ EDTA и 0,05% поверхностно-активного вещества P20), захватывали в отдельных проточных ячейках сенсорного чипа с белком А серии S (GE Healthcare Ltd, № по кат. 29-1275-56), оставив одну проточную ячейку в качестве эталона. Полиспецифические молекулы захватывали с применением 30-секундной инъекции с расходом 10 мкл/мин до достижения приблизительно 1000 резонансных единиц (RU). Затем протокол двойной инъекции Biacore T200 использовали для двух отдельных инъекций разных образцов TIGIT и/или CD96, одна непосредственно за другой. Первая инъекция содержала 100 нМ полноразмерного ECD TIGIT человека (SEQ ID NO: 113) в течение 3-минутной фазы ассоциации, затем непосредственно следовала вторая 3-минутная инъекция либо буфер, 100 нМ полноразмерного ECD TIGIT человека (SEQ ID NO: 113), смесь 100 нМ полноразмерного ECD TIGIT человека (SEQ ID

NO: 113) и 100 нМ полноразмерного ECD изоформы 2 CD96 человека с мутацией С89S (SEQ ID NO: 63), либо 100 нМ полноразмерного ECD изоформы 2 CD96 человека с мутацией С89S (SEQ ID NO: 63). После второй инъекции следовала 10-минутная фаза диссоциации. Между циклами сенсорный чип регенерировали посредством двух 30-секундных инъекций 10 мМ глицина, рН 1,5. Сенсограммы оценивали с применением программного обеспечения VIAevaluation 3.0.

[00557] Как показано на фигурах 1А-1С, ВА123 (фигура 1А), ВА125 (фигура 1В) и ВА127 (фигура 1С) способны одновременно связываться с белками TIGIT человека и CD96 человека, как продемонстрировано повышением сигнала (RU), которое возникает когда через полиспецифическую молекулу, связанную с TIGIT, последовательно пропускают смесь TIGIT и CD96, что указывает на связывание CD96 с другой антигенсвязывающей областью полиспецифической молекулы.

Анализ связывания клеток

[00558] В данном примере одновременное связывание полиспецифической молекулы к TIGITxCD96 ВА127 с клетками СНО, сконструированными для экспрессии TIGIT человека или CD96 человека, сравнивали с контрольными полиспецифическими молекулами ВА128, ВА131 и ВА133.

[00559] Линии клеток СНО, экспрессирующие TIGIT человека или CD96 человека, культивировали в среде Power СНО-2, содержащей 1 мкг/мл пуромицина, во встряхиваемых колбах при 37°C. Для анализа связывания антитела клетки СНО, экспрессирующие TIGIT или CD96 человека, извлекали из инкубатора и переносили в пробирку, содержащую культуру клеток. Клетки центрифугировали при 300g в течение пяти минут. Супернатант удаляли, а клетки, ресуспендированные в буфере для FACS (холодный PBS, дополненный 2% фетальной бычьей сывороткой), высевали в 96-луночный планшет для тканевых культур с U-образным дном при плотности 1×10^5 клеток на лунку в 50 мкл.

[00560] Антитела получали в отдельном микропланшете. Антитела серийно разбавляли в соотношении 1 к 3 буфером для FACS. Всего получали 12 рабочих разбавлений, находящихся в диапазоне от 90 мкг/мл до 0,0005 мкг/мл, для связывания с СНО, экспрессирующими TIGIT человека, или от 30 мкг/мл до 0,0002 мкг/мл для связывания с СНО, экспрессирующими CD96 человека. Клетки центрифугировали при 300g в течение пяти минут, супернатант удаляли и клетки ресуспендировали в 50 мкл смеси антител. Клетки инкубировали при 4°C в течение 45 минут. Через 45 минут клетки промывали 2X буфером для FACS и супернатант удаляли.

[00561] Как показано на фигурах 2А и 2В, полиспецифическая молекула к TIGITxCD96 ВА127 была способна одновременно связываться с TIGIT человека и CD96 человека по сравнению с контрольными полиспецифическими молекулами ВА128, ВА131 и ВА133. Двойное связывание экспрессируемого клетками TIGIT человека и растворимого His-меченного CD96 человека (фигура 2А) или экспрессируемого клетками CD96 человека и растворимого His-меченного TIGIT человека (фигура 2В) определяли

посредством проточной цитометрии с применением конъюгированного с флуорохромом (Alex Fluor 488) антитела к His.

8.5 Пример 5. Определение характеристик ведущей панели полиспецифических молекул к TIGITxCD96

8.5.1 Полиспецифические молекулы к TIGITxCD96 связываются с клетками, экспрессирующими CD96 человека и яванского макака

[00562] В данном примере способность полиспецифических молекул к TIGITxCD96 связываться с CD96 человека дикого типа или CD96 яванского макака дикого типа на поверхности различных типов клеток тестировали *in vitro* посредством проточной цитометрии.

Связывание с клетками CHO, экспрессирующими CD96 человека

[00563] Оценивали способность полиспецифических молекул к TIGITxCD96 связываться с CD96 человека, экспрессируемым на поверхности клеток CHO. Вкратце, клетки CHO трансфицировали вектором, кодирующим полноразмерную изоформу 1 или изоформу 2 CD96 человека дикого типа (клетки CHO, экспрессирующие CD96 человека), и отбирали клоны, стабильно экспрессирующие изоформу 1 или изоформу 2 CD96 дикого типа. Стабильные линии клеток культивировали в среде Power CHO-2, содержащей 4 мМ L-глутамин, 100 ед./мл 1x НТ-добавки и 2,5 мкг/мл пурамицина.

[00564] Для анализа связывания антител замороженную аликвоту клеток CHO, экспрессирующих CD96 человека (изоформу 1 или изоформу 2), размораживали при 37°C и затем переносили в пробирку, содержащую DPBS, дополненный 0,5% бычьего сывороточного альбумина и 0,05% азида натрия (буфер для FACS). Клетки центрифугировали при 300g в течение пяти минут. Супернатант удаляли, а клетки, ресуспендированные в буфере для FACS, высевали в 96-луночный планшет для тканевых культур с U-образным дном при плотности 2×10^5 клеток на лунку в 50 мкл. В отдельном микропланшете получали 2x концентрированный промежуточный стоковый раствор каждого антитела. Антитела серийно разбавляли в соотношении 1 к 3 буфером для FACS. Всего получали 11 рабочих разбавлений в диапазоне концентраций от 60 мкг/мл до 0,001 мкг/мл. Затем пятьдесят микролитров каждого разбавления переносили в микропланшет, содержащий клетки CHO, экспрессирующие CD96 человека. Затем клетки инкубировали в течение 45 минут при 4°C. Для окрашивания антител клетки дважды промывали холодным буфером для FACS и ресуспендировали в буфере для FACS, содержащем козий F(ab')₂-фрагмент от AffiniPure к IgG человека, меченный R-фикоэритрином (PE), со специфичностью к фрагменту Fcγ (Jackson, №№ по кат. 109-116-098), при конечном разбавлении 1:800. После 30-минутной инкубации на льду клетки дважды промывали холодным буфером для FACS и клетки анализировали посредством проточной цитометрии (проточный цитометр BD LSR Fortessa). Данные анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo путем последовательного гейтирования FSC-A относительно SSC-A и SSC-H относительно SSC-A. Рассчитывали средние значения интенсивности флуоресценции (MFI) для PE и данные наносили на

график с помощью программного обеспечения GraphPad Prism. Данное программное обеспечение использовали для определения концентрации полиспецифической молекулы, приводящей к 50% от максимального связывания (эффективная концентрация 50, [EC50]), путем аппроксимации кривой с использованием четырехпараметрического логистического уравнения.

[00565] Как показано на фигурах 3А-3I (изоформа 2) и фигурах 4А-4I (изоформа 1), ВА123, ВА125, ВА127, ВА129, ВА130, ВА131, ВА134 и ВА136 связывались с клетками СНО, экспрессирующими CD96 человека, дозозависимым образом. Средние значения EC50 рассчитывали для каждого антитела, и они приведены в таблицах 14 и 16 (для изоформы 2 и изоформы 1 соответственно). Площадь под кривой (AUC) рассчитывали для иллюстративного эксперимента, и она приведена в таблицах 15 и 17 (для изоформы 2 и изоформы 1 соответственно).

Таблица 14. Значения EC50 для связывания полиспецифических молекул к TIGITxCD96 с клетками СНО, экспрессирующими CD96 человека (изоформа 2).*

Полиспецифическая молекула	EC50 (среднее геометрическое значение), нг/мл
ВА123	196,3
ВА125	81,1
ВА127	95,1
ВА129	1921,7
ВА130	468,1
ВА131	697,4
ВА133	Связывание отсутствует
ВА134	123,4
ВА136	341,3

*Рассчитано по результатам 2 экспериментов.

Таблица 15. Значения AUC для иллюстративного эксперимента, демонстрирующего связывание полиспецифических молекул к TIGITxCD96 с клетками СНО, экспрессирующими CD96 человека (изоформа 2).

Полиспецифическая молекула	Площадь под кривой (AUC)	Стандартная ошибка
ВА123	102640	N/A
ВА125	131901	1551
ВА127	131867	2754
ВА128	6875	N/A
ВА129	70253	1258
ВА130	91914	1450
ВА131	109014	2236

Полиспецифическая молекула	Площадь под кривой (AUC)	Стандартная ошибка
BA133	21002	N/A
BA134	163929	N/A
BA136	153274	N/A

Таблица 16. Значения EC50 для связывания полиспецифических молекул к TIGITxCD96 с клетками CHO, экспрессирующими CD96 человека (изоформа 1).

Полиспецифическая молекула	EC50, нг/мл
BA123	11,3
BA125	108,4
BA127	48,9
BA129	123,3
BA130	30,2
BA131	9,9
BA133	Связывание отсутствует
BA134	8,1
BA136	10,7

*Расчитано по результатам 1 эксперимента.

Таблица 17. Значения AUC для иллюстративного эксперимента, демонстрирующего связывание полиспецифических молекул к TIGITxCD96 с клетками CHO CHO, экспрессирующими CD96 человека (изоформа 1).

Полиспецифическая молекула	Площадь под кривой (AUC)	Стандартная ошибка
BA123	92383	2595
BA125	132860	2507
BA127	143733	4872
BA128	5149	N/A
BA129	39804	425,4
BA130	46824	1692
BA131	52417	1935
BA133	19339	N/A
BA134	81530	N/A
BA136	152868	N/A

Связывание с клетками CHO, экспрессирующими CD96 яванского макака

[00566] В подобных экспериментах тестировали способность полиспецифических

молекул к TIGITxCD96 связываться с клетками CHO, сконструированными для экспрессии CD96 яванского макака дикого типа (изоформы 2), на их клеточных поверхностях (клетки CHO, экспрессирующие CD96 яванского макака). Вкратце, клетки CHO трансфицировали вектором, кодирующим полноразмерную изоформу 2 CD96 яванского макака дикого типа, и отбирали клон, стабильно экспрессирующий CD96. Стабильную линию клеток культивировали в среде Power CHO-2, содержащей 4 мМ L-глутамин, 100 ед./мл 1x НТ-добавки и 2,5 мкг/мл пурамицина. Способность полиспецифических молекул к TIGITxCD96 связываться с клетками CHO, экспрессирующими CD96 яванского макака, определяли так, как описано выше для клеток CHO, экспрессирующих CD96 человека.

[00567] Как показано на фигурах 5A-5I, полиспецифические молекулы к TIGITxCD96 BA123, BA127, BA129, BA131, BA134 и BA136 связывались с клетками CHO, экспрессирующими CD96 яванского макака, дозозависимым образом. Значения EC50 для связывания полиспецифических молекул к TIGITxCD96 с клетками CHO, экспрессирующими CD96 яванского макака, рассчитывали для каждого антитела, и они приведены в таблице 18. Рассчитывали площадь под кривой (AUC), и она приведена в таблице 19.

Таблица 18. Значения EC50 для связывания полиспецифических молекул к TIGITxCD96 с клетками CHO, экспрессирующими CD96 яванского макака (изоформа 2).*

Полиспецифическая молекула	EC50, нг/мл
BA123	1039
BA125	Связывание отсутствует
BA127	Не подходит
BA129	323,8
BA130	Связывание отсутствует
BA131	Не подходит
BA133	Связывание отсутствует
BA134	202,2
BA136	415,3

*Рассчитано по результатам 1 эксперимента.

Таблица 19. Значения AUC для иллюстративного эксперимента, демонстрирующего связывание полиспецифических молекул к TIGITxCD96 с клетками CHO, экспрессирующими CD96 яванского макака (изоформа 2).

Полиспецифическая молекула	Площадь под кривой (AUC)	Стандартная ошибка
BA123	3179	59,2

BA125	486	3,6
BA127	2016	72,8
BA128	580	N/A
BA129	3076	69,5
BA130	499	8,7
BA131	1667	56,4
BA133	708	N/A
BA134	4357	N/A
BA136	4350	N/A

8.5.2 Полиспецифические молекулы к TIGITxCD96 блокируют связывание лигандов с CD96 человека

[00568] Способность полиспецифических молекул к TIGITxCD96 блокировать связывание между CD96 человека дикого типа (изоформа 2) или CD96 яванского макака дикого типа (изоформа 2) и его лигандом CD155 тестировали *in vitro* посредством проточной цитометрии.

Блокирование связывания клеток CHO, экспрессирующих CD96 человека, с растворимым CD155 человека

[00569] Полиспецифические молекулы к TIGITxCD96 тестировали посредством проточной цитометрии *in vitro* в отношении их способности блокировать связывание между CD96 человека дикого типа (изоформы 2), сверхэкспрессируемым на клетках CHO, и растворимым CD155 человека *in vitro*.

[00570] Вкратце, в буфере для FACS получали раствор, содержащий 2 мкг/мл CD155-Fc человека, конъюгированного с R-фикоэритрином (CD155-Fc-PE). Затем пятьдесят микролитров данного рабочего стокового раствора CD155-Fc-PE человека добавляли в лунки 96-луночного микропланшета с U-образным дном. В микропланшете получали 4x концентрированный промежуточный стоковый раствор каждой полиспецифической молекулы. Антитела серийно разбавляли в соотношении 1 к 3 буфером для FACS. Всего получали 11 рабочих разбавлений в диапазоне концентраций от 120 мкг/мл до 0,002 мкг/мл. Двадцать пять микролитров каждого разбавления добавляли в микропланшет, содержащий CD155-Fc-PE. Наконец, 25 мкл клеток CHO, экспрессирующих CD96 человека дикого типа (изоформу 2), полученных как описано выше, добавляли в каждую лунку. После 30-минутной инкубации на льду клетки дважды промывали холодным буфером для FACS и клетки анализировали посредством проточной цитометрии (проточный цитометр BD LSR Fortessa). Данные анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo путем последовательного гейтирования по FSC-A относительно SSC-A и SSC-H относительно SSC-A. Рассчитывали средние значения интенсивности флуоресценции (MFI) для PE и данные наносили на график с помощью программного обеспечения GraphPad Prism и анализировали так, как

описано выше. Для каждой концентрации антитела экспериментальные данные подвергали нормализации с использованием значений MFI, полученных для клеток CHO, экспрессирующих CD96 человека, инкубированных с CD155-Fc-PE в отсутствие полиспецифических молекул, и значений MFI для аутофлуоресценции клеток CHO, экспрессирующих CD96 человека (фон), в соответствии с уравнением 1.

Уравнение 1

% максимального сигнала =

$(\text{MFI «полиспецифической молекулы»} - \text{MFI «фона»}) / ((\text{«общая» MFI} - \text{MFI «фона»}),$

где

«полиспецифическая молекула» представляет собой BA123, BA125, BA127, BA129, BA130, BA131, BA133, BA134 или BA136,

«фон» обозначает только клетки (без антитела или CD155-Fc-PE),

«общая» обозначает клетки, инкубированные с CD155-Fc-PE в отсутствие антител

[00571] Определяли концентрацию полиспецифической молекулы, ингибирующую 50% (IC50) связывания CD155-Fc-PE с клетками CHO, экспрессирующими CD96 человека. Значения IC50 рассчитывали с применением программного обеспечения GraphPad Prism путем аппроксимации кривой с применением четырехпараметрического логистического уравнения.

[00572] Как показано на фигурах 6A-6I, BA123, BA125, BA127, BA129, BA130, BA131, BA134 и BA136 блокировали связывание CD96 человека с CD155. Средние значения IC50 рассчитывали для каждого антитела, и они приведены в таблице 20. Площадь под кривой (AUC) рассчитывали для иллюстративного эксперимента, и она приведена в таблице 21.

Таблица 20. Значения IC50 для полиспецифических молекул к TIGITxCD96, блокирующих связывание клеток CHO, экспрессирующих CD96 человека (изоформу 2), с CD155 человека.*

Полиспецифическая молекула	IC50 (среднее геометрическое значение), нг/мл
BA123	5633
BA125	3489
BA127	1992
BA129	11460
BA130	7603
BA131	4698
BA133	Не является блокатором
BA134	1363
BA136	983

*Рассчитано по результатам 3 экспериментов.

Таблица 21. Значения AUC для иллюстративного эксперимента, демонстрирующего, что полиспецифические молекулы к TIGITxCD96 блокируют связывание клеток CHO, экспрессирующих CD96 человека (изоформу 2), с CD155 человека.

Полиспецифическая молекула	Площадь под кривой (AUC)	Стандартная ошибка
BA123	379,7	1,66
BA125	360,8	2,02
BA127	338,6	2,94
BA128	466,4	N/A
BA129	404,8	2,78
BA130	396,3	3,25
BA131	385,0	1,98
BA133	455,9	N/A
BA134	328,8	N/A
BA136	340,7	N/A

Блокирование связывания клеток CHO, экспрессирующих CD96 яванского макака, с растворимым CD155 человека

[00573] В подобных экспериментах полиспецифические молекулы к TIGITxCD96 тестировали посредством проточной цитометрии *in vitro* в отношении их способности блокировать связывание между CD96 яванского макака дикого типа (изоформа 2), сверхэкспрессируемым на клетках CHO, и растворимым CD155 человека *in vitro*, как описано для клеток CHO, экспрессирующих CD96 человека, выше.

[00574] Определяли концентрацию антитела, ингибирующую 50% (IC50) связывания CD155-Fc-PE с клетками CHO, экспрессирующими CD96 человека. Значения IC50 рассчитывали с применением программного обеспечения GraphPad Prism путем аппроксимации кривой с применением четырехпараметрического логистического уравнения.

[00575] Как показано на фигурах 7A-7I, полиспецифические молекулы к TIGITxCD96 BA129, BA131, BA134 и BA136 частично блокируют взаимодействие между CD96 яванского макака дикого типа и CD155 человека. Невозможно рассчитать значения IC50, поскольку полиспецифические молекулы являются частичными блокаторами. Рассчитывали площадь под кривой (AUC), и она приведена в таблице 22.

Таблица 22. Значения AUC для иллюстративного эксперимента, демонстрирующего, что полиспецифические молекулы к TIGITxCD96 блокируют связывание клеток CHO, экспрессирующих CD96 яванского макака (изоформу 2), с CD155 человека.

Полиспецифическая молекула	Площадь под кривой (AUC)	Стандартная ошибка
BA123	440,0	3,74
BA125	452,7	3,94
BA127	442,8	5,07
BA128	427,3	N/A
BA129	412,2	7,08
BA130	430,6	5,12
BA131	432,9	2,23
BA133	455,2	N/A
BA134	401,4	N/A
BA136	403,2	N/A

8.5.3 Полиспецифические молекулы к TIGITxCD96 связываются с клетками, экспрессирующими TIGIT человека и яванского макака

[00576] Способность полиспецифических молекул к TIGITxCD96 связываться с TIGIT человека дикого типа или TIGIT яванского макака дикого типа на поверхности различных типов клеток тестировали *in vitro* посредством проточной цитометрии.

Связывание с клетками СНО, экспрессирующими TIGIT человека

[00577] Оценивали способность полиспецифических молекул к TIGITxCD96 связываться с TIGIT человека дикого типа, экспрессируемым на поверхности клеток СНО. Вкратце, клетки СНО трансфицировали вектором, кодирующим полноразмерный TIGIT человека дикого типа (клетки СНО, экспрессирующие TIGIT человека), и отбирали клоны, стабильно экспрессирующие TIGIT. Стабильные линии клеток культивировали в среде Power СНО-2, содержащей 4 мМ L-глутамин, 100 ед./мл 1x НТ-добавки и 2,5 мкг/мл пурамицина.

[00578] Для анализа связывания антител замороженную аликвоту клеток СНО, экспрессирующих TIGIT человека, размораживали при 37°C и затем переносили в пробирку, содержащую DPBS, дополненный 0,5% бычьего сывороточного альбумина и 0,05% азида натрия (буфер для FACS). Клетки центрифугировали при 300g в течение пяти минут. Супернатант удаляли, а клетки, ресуспендированные в буфере для FACS, высевали в 96-луночный планшет для тканевых культур с U-образным дном при плотности 2×10^5 клеток на лунку в 50 мкл. В отдельном микропланшете получали 2x концентрированный промежуточный стоковый раствор каждого антитела. Антитела серийно разбавляли в соотношении 1 к 4 буфером для FACS. Всего получали 11 рабочих разбавлений в диапазоне концентраций от 60 мкг/мл до 0,000057 мкг/мл. Затем пятьдесят микролитров каждого разбавления переносили в микропланшет, содержащий клетки СНО, экспрессирующие TIGIT человека. Затем клетки инкубировали в течение 45 минут при 4°C. Для окрашивания антител клетки дважды промывали холодным буфером для FACS и

ресуспендировали в буфере для FACS, содержащем козий F(ab')₂-фрагмент от AffiniPure к IgG человека, меченный R-фикоэритрином (PE), со специфичностью к фрагменту Fcγ (Jackson, № по кат. 109-116-098), при конечном разбавлении 1:800. После 30-минутной инкубации на льду клетки дважды промывали холодным буфером для FACS и клетки анализировали посредством проточной цитометрии (проточный цитометр BD LSR Fortessa). Данные анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo путем последовательного гейтирования FSC-A относительно SSC-A и SSC-H относительно SSC-A. Рассчитывали средние значения интенсивности флуоресценции (MFI) для PE и данные наносили на график с помощью программного обеспечения GraphPad Prism. Данное программное обеспечение использовали для определения концентрации полиспецифической молекулы, приводящей к 50% от максимального связывания (эффективная концентрация 50, [EC50]), путем аппроксимации кривой с использованием четырехпараметрического логистического уравнения.

[00579] Как показано на фигурах 8A-8I, BA123, BA125, BA127, BA133 и BA136 связывались с клетками СНО, экспрессирующими TIGIT человека, дозозависимым образом. Средние значения EC50 рассчитывали для каждой полиспецифической молекулы, и они приведены в таблице 23. Площадь под кривой (AUC) рассчитывали для иллюстративного эксперимента, и она приведена в таблице 24.

Таблица 23. Значения EC50 для связывания полиспецифических молекул с клетками СНО, экспрессирующими TIGIT человека.*

Полиспецифическая молекула	EC50 (среднее геометрическое значение), нг/мл
BA123	44,9
BA125	30,7
BA127	33,0
BA129	Связывание отсутствует
BA130	Связывание отсутствует
BA131	Связывание отсутствует
BA133	27,1
BA134	Связывание отсутствует
BA136	28,4

*Рассчитано по результатам 2 экспериментов.

Таблица 24. Значения AUC для иллюстративного эксперимента, демонстрирующего связывание полиспецифических молекул к TIGITxCD96 с клетками СНО, экспрессирующими TIGIT человека.

Полиспецифическая молекула	Площадь под кривой (AUC)	Стандартная ошибка
BA123	143147	1866

BA125	133572	8920
BA127	122832	3169
BA128	1304	N/A
BA129	1197	75,4
BA130	1437	94,2
BA131	1297	148,5
BA133	160549	N/A
BA134	3073	N/A
BA136	156823	N/A

Связывание с клетками СНО, экспрессирующими TIGIT яванского макака

[00580] В подобных экспериментах тестировали способность полиспецифических молекул к TIGITxCD96 связываться с клетками СНО, сконструированными для экспрессии TIGIT яванского макака дикого типа, на их клеточных поверхностях (клетки СНО, экспрессирующие TIGIT яванского макака). Вкратце, клетки СНО трансфицировали вектором, кодирующим полноразмерный TIGIT яванского макака дикого типа, и отбирали клон, стабильно экспрессирующий TIGIT. Стабильную линию клеток культивировали в среде Power СНО-2, содержащей 4 mM L-глутамин, 100 ед./мл 1x НТ-добавки и 2,5 мкг/мл пуромицина. Способность полиспецифических молекул к TIGITxCD96 связываться с клетками СНО, экспрессирующими TIGIT яванского макака, определяли так, как описано выше для клеток СНО, экспрессирующих TIGIT человека.

[00581] Как показано на фигурах 9А-9І, BA123, BA125, BA127, BA133 и BA136 связывались с клетками СНО, экспрессирующими TIGIT яванского макака, дозозависимым образом. Средние значения EC50 для связывания антител с клетками СНО, экспрессирующими TIGIT яванского макака, рассчитывали для каждого антитела, и они приведены в таблице 25. Площадь под кривой (AUC) рассчитывали для иллюстративного эксперимента, и она приведена в таблице 26.

Таблица 25. Значения EC50 для связывания полиспецифических молекул к TIGITxCD96 с клетками СНО, экспрессирующими TIGIT яванского макака.*

Полиспецифическая молекула	EC50 (среднее геометрическое значение), нг/мл
BA123	165,0
BA125	406,1
BA127	257,7
BA129	Связывание отсутствует
BA130	Связывание отсутствует
BA131	Связывание отсутствует
BA133	235,1
BA134	Связывание отсутствует

BA136	456,9
-------	-------

*Рассчитано по результатам 2 экспериментов.

Таблица 26. Значения AUC для иллюстративного эксперимента, демонстрирующего связывание полиспецифических молекул к TIGITxCD96 с клетками CHO, экспрессирующими TIGIT яванского макака.

Полиспецифическая молекула	Площадь под кривой (AUC)	Стандартная ошибка
BA123	88592	1340
BA125	119819	1077
BA127	110887	1811
BA128	594	N/A
BA129	546	18
BA130	715	114
BA131	554	5
BA133	87757	N/A
BA134	584	N/A
BA136	96962	N/A

8.5.4 Полиспецифические молекулы к TIGITxCD96 блокируют связывание лигандов с TIGIT

[00582] Способность полиспецифических молекул к TIGITxCD96 блокировать связывание между TIGIT человека дикого типа или TIGIT яванского макака дикого типа и его лигандом CD155 человека тестировали *in vitro* посредством проточной цитометрии.

Блокирование связывания клеток CHO, экспрессирующих TIGIT человека, с растворимым CD155 человека

[00583] В данном примере тестировали способность полиспецифических молекул к TIGITxCD96 блокировать связывание между TIGIT человека дикого типа и его лигандом CD155 человека (также называемым PVR). В частности, антитела тестировали *in vitro* в отношении их способности блокировать связывание между TIGIT человека, сверхэкспрессируемым на клетках CHO, и растворимым CD155 человека, посредством проточной цитометрии.

[00584] Вкратце, в буфере для FACS получали раствор, содержащий 2 мкг/мл CD155-Fc человека, конъюгированного с R-фикоэритрином (CD155-Fc-PE). Затем пятьдесят микролитров данного рабочего стокового раствора CD155-Fc-PE человека добавляли в лунки 96-луночного микропланшета с U-образным дном. В микропланшете получали 4x концентрированный промежуточный стоковый раствор каждой полиспецифической молекулы. Антитела серийно разбавляли в соотношении 1 к 3 буфером для FACS. Всего получали 11 рабочих разбавлений в диапазоне концентраций от 120 мкг/мл до 0,002 мкг/мл. Двадцать пять микролитров каждого разбавления добавляли в

микропланшет, содержащий CD155-Fc-PE. Наконец, 25 мкл клеток CHO, экспрессирующих TIGIT человека, полученных как описано выше, добавляли в каждую лунку. После 30-минутной инкубации на льду клетки дважды промывали холодным буфером для FACS и клетки анализировали посредством проточной цитометрии (проточный цитометр BD LSR Fortessa). Данные анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo путем последовательного гейтирования по FSC-A относительно SSC-A и SSC-H относительно SSC-A. Рассчитывали средние значения интенсивности флуоресценции (MFI) для PE и данные наносили на график с помощью программного обеспечения GraphPad Prism и анализировали так, как описано выше. Для каждой концентрации антитела экспериментальные данные подвергали нормализации с использованием значений MFI, полученных для клеток CHO, экспрессирующих TIGIT человека, инкубированных с CD155-Fc-PE в отсутствие полиспецифических молекул, и значений MFI для аутофлуоресценции клеток CHO, экспрессирующих TIGIT человека (фон), в соответствии с уравнением 2.

Уравнение 2

% максимального сигнала =

$(\text{MFI «полиспецифической молекулы»} - \text{MFI «фона»}) / (\text{«общая» MFI} - \text{MFI «фона»}),$

где

«полиспецифическая молекула» представляет собой BA123, BA125, BA127, BA129, BA130, BA131, BA133, BA134 или BA136,

«фон» обозначает только клетки (без антитела или CD155-Fc-PE),

«общая» обозначает клетки, инкубированные с CD155-Fc-PE в отсутствие антител

[00585] Определяли концентрацию полиспецифической молекулы, ингибирующую 50% (IC50) связывания CD155-Fc-PE с клетками CHO, экспрессирующими TIGIT человека. Значения IC50 рассчитывали с применением программного обеспечения GraphPad Prism путем аппроксимации кривой с применением четырехпараметрического логистического уравнения.

[00586] Как показано на фигурах 10A-10I, BA123, BA125, BA127, BA133 и BA136 блокировали связывание TIGIT человека с CD155. Средние значения IC50 рассчитывали для каждого антитела, и они приведены в таблице 27. Площадь под кривой (AUC) рассчитывали для иллюстративного эксперимента, и она приведена в таблице 28.

Таблица 27. Значения IC50 для полиспецифических молекул к TIGITxCD96, блокирующих связывание клеток CHO, экспрессирующих TIGIT человека, с CD155 человека.*

Полиспецифическая молекула	IC50 (среднее геометрическое значение), нг/мл
BA123	142
BA125	135
BA127	164

BA129	Не является блокатором
BA130	Не является блокатором
BA131	Не является блокатором
BA133	200
BA134	Не является блокатором
BA136	144

*Расчитано по результатам 3 экспериментов.

Таблица 28. Значения AUC для иллюстративного эксперимента, демонстрирующего, что полиспецифические молекулы к TIGITxCD96 блокируют связывание клеток CHO, экспрессирующих TIGIT человека, с CD155 человека.

Полиспецифическая молекула	Площадь под кривой (AUC)	Стандартная ошибка
BA123	221,4	2,53
BA125	210,7	0,93
BA127	228,9	1,32
BA128	449,3	N/A
BA129	462,1	2,14
BA130	456,7	2,01
BA131	460,4	2,83
BA133	244,5	N/A
BA134	453,5	N/A
BA136	216,8	N/A

Блокирование связывания клеток CHO, экспрессирующих TIGIT яванского макака, с растворимым CD155 человека

[00587] В подобных экспериментах тестировали способность полиспецифических молекул к TIGITxCD96 блокировать связывание между TIGIT яванского макака дикого типа и его лигандом CD155 человека (также называемым PVR). Вкратце, антитела тестировали посредством проточной цитометрии *in vitro* в отношении их способности блокировать связывание между TIGIT яванского макака дикого типа, сверхэкспрессируемым на клетках CHO, и растворимым CD155 человека, как описано для клеток CHO, экспрессирующих TIGIT человека, выше.

[00588] Определяли концентрацию антитела, ингибирующую 50% (IC50) связывания CD155-Fc-PE с клетками CHO, экспрессирующими TIGIT человека. Значения IC50 рассчитывали с применением программного обеспечения GraphPad Prism путем аппроксимации кривой с применением четырехпараметрического логистического уравнения.

[00589] Как показано на фигурах 11A-11I, полиспецифические молекулы к

TIGITxCD96 BA123, BA125, BA127, BA133 и BA136 блокируют взаимодействие между CD96 яванского макака и CD155. Средние значения IC50 рассчитывали для каждого антитела, и они приведены в таблице 29. Площадь под кривой (AUC) рассчитывали для иллюстративного эксперимента, и она приведена в таблице 30.

Таблица 29. Значения IC50 для полиспецифических молекул к TIGITxCD96, блокирующих связывание клеток СНО, экспрессирующих TIGIT яванского макака, с CD155 человека.*

Полиспецифическая молекула	IC50 (среднее геометрическое значение), нг/мл
BA123	2354
BA125	2763
BA127	2811
BA129	Не является блокатором
BA130	Не является блокатором
BA131	Не является блокатором
BA133	2641
BA134	Не является блокатором
BA136	2538

*Рассчитано по результатам 2 экспериментов.

Таблица 30. Значения AUC для иллюстративного эксперимента, демонстрирующего, что полиспецифические молекулы к TIGITxCD96 блокируют связывание клеток СНО, экспрессирующих TIGIT яванского макака, с CD155 человека.

Полиспецифическая молекула	Площадь под кривой (AUC)	Стандартная ошибка
BA123	104427	784,1
BA125	114383	675,9
BA127	352,6	6,715
BA128	156744	N/A
BA129	128554	963,7
BA130	137195	1610
BA131	432,4	2,426
BA133	115364	N/A
BA134	155862	N/A
BA136	110003	N/A

8.5.5 Полиспецифические молекулы к TIGITxCD96 связываются с клетками, совместно экспрессирующими TIGIT человека и CD96 человека

[00590] Способность полиспецифических молекул к TIGITxCD96 связываться с TIGIT человека или CD96 человека на поверхности различных типов клеток тестировали *in vitro* посредством проточной цитометрии.

Связывание с клетками CHO, совместно экспрессирующими TIGIT человека и CD96 человека

[00591] Оценивали способность полиспецифических молекул к TIGITxCD96 связываться с TIGIT человека дикого типа и CD96 человека дикого типа, совместно экспрессируемыми на поверхности клеток CHO. Вкратце, клетки CHO трансфицировали вектором, кодирующим TIGIT человека дикого типа (клетки CHO, экспрессирующие TIGIT человека), и отбирали клоны, стабильно экспрессирующие TIGIT. Эти клетки затем трансфицировали вектором, кодирующим CD96 человека дикого типа (изоформу 2), с получением линии клеток, экспрессирующей как TIGIT человека, так и CD96 человека (клетки CHO, экспрессирующие TIGIT и CD96 человека). Эти стабильные линии клеток культивировали в среде Power CHO-2, содержащей 4 mM L-глутамин, 100 ед./мл 1x НТ-добавки и 2,5 мкг/мл пуромидина. Экспрессию подтверждали посредством проточной цитометрии. Клетки были клональными по высокому уровню экспрессии TIGIT, но характеризовались диапазоном уровней экспрессии CD96.

[00592] Для анализа связывания антител замороженную аликвоту клеток CHO, экспрессирующих TIGIT и CD96 человека, размораживали при 37°C и затем переносили в пробирку, содержащую DPBS, дополненный 0,5% бычьего сывороточного альбумина и 0,05% азида натрия (буфер для FACS). Клетки центрифугировали при 300g в течение пяти минут. Супернатант удаляли, а клетки, ресуспендированные в буфере для FACS, высевали в 96-луночный планшет для тканевых культур с U-образным дном при плотности 2×10^5 клеток на лунку в 50 мкл. В отдельном микропланшете получали 2x концентрированный промежуточный стоковый раствор каждого антитела. Антитела серийно разбавляли в соотношении 1 к 3 буфером для FACS. Всего получали 11 рабочих разбавлений в диапазоне концентраций от 60 мкг/мл до 0,001 мкг/мл. Затем пятьдесят микролитров каждого разбавления переносили в микропланшет, содержащий клетки CHO, экспрессирующие TIGIT и CD96 человека. Затем клетки инкубировали в течение 45 минут при 4°C. Для окрашивания антител клетки дважды промывали холодным буфером для FACS и ресуспендировали в буфере для FACS, содержащем козий F(ab')₂-фрагмент от AffiniPure к IgG человека, меченный R-фикоэритрином (PE), со специфичностью к фрагменту Fc γ (Jackson, № по кат. 109-116-098), при конечном разбавлении 1:800. После 30-минутной инкубации на льду клетки дважды промывали холодным буфером для FACS и клетки анализировали посредством проточной цитометрии (проточный цитометр BD LSR Fortessa). Данные анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo путем последовательного гейтирования FSC-A относительно SSC-A и SSC-H относительно SSC-A. Рассчитывали средние значения интенсивности флуоресценции (MFI) для PE и данные наносили на график с помощью программного обеспечения GraphPad Prism. Данное программное обеспечение использовали для определения

концентрации полиспецифической молекулы, приводящей к 50% от максимального связывания (эффективная концентрация 50, [EC50]), путем аппроксимации кривой с использованием четырехпараметрического логистического уравнения.

[00593] Как показано на фигурах 12А-12I, ВА123, ВА125, ВА127, ВА129, ВА130, ВА131, ВА133, ВА134 и ВА136 связывались с клетками СНО, экспрессирующими TIGIT и CD96 человека, дозозависимым образом. Средние значения EC50 рассчитывали для каждого полиспецифического антитела, и они приведены в таблице 31. Площадь под кривой (AUC) рассчитывали для иллюстративного эксперимента, и она приведена в таблице 32.

Таблица 31. Значения EC50 для связывания полиспецифических молекул к TIGITxCD96 с клетками СНО, экспрессирующими TIGIT и CD96 человека.*

Полиспецифическая молекула	EC50 (среднее геометрическое значение), нг/мл
ВА123	2,36
ВА125	2,58
ВА127	11,91
ВА129	Не подходит
ВА130	Не подходит
ВА131	Не подходит
ВА133	24,37
ВА134	Не подходит
ВА136	4,40

*Рассчитано по результатам 2 экспериментов.

Таблица 32. Значения AUC для иллюстративного эксперимента, демонстрирующего связывание полиспецифических молекул к TIGITxCD96 с клетками СНО, экспрессирующими TIGIT и CD96 человека.

Полиспецифическая молекула	Площадь под кривой (AUC)	Стандартная ошибка
ВА123	145831	2716
ВА125	172085	6165
ВА127	156923	2020
ВА128	1458	N/A
ВА129	7233	128,9
ВА130	8971	122,6
ВА131	13367	374,9
ВА133	131494	N/A

Полиспецифическая молекула	Площадь под кривой (AUC)	Стандартная ошибка
BA134	15662	N/A
BA136	177760	N/A

8.5.6 Полиспецифические молекулы к TIGITxCD96 блокируют связывание лигандов с клетками, совместно экспрессирующими TIGIT человека и CD96 человека

[00594] Способность полиспецифических молекул к TIGITxCD96 блокировать связывание между TIGIT человека и CD96 человека на поверхности различных типов клеток тестировали *in vitro* посредством проточной цитометрии.

Блокирование связывания растворимого CD155 человека с клетками CHO, экспрессирующими TIGIT человека и CD96 человека

[00595] В данном примере тестировали способность полиспецифических молекул к TIGITxCD96 блокировать связывание между TIGIT человека дикого типа и CD96 человека дикого типа и их лигандом CD155 человека (также называемым PVR). В частности, антитела тестировали *in vitro* в отношении их способности блокировать связывание между TIGIT человека и CD96 человека, сверхэкспрессируемыми на клетках CHO, и растворимым CD155 человека, посредством проточной цитометрии.

[00596] Вкратце, в буфере для FACS получали раствор, содержащий 2 мкг/мл CD155-Fc человека, конъюгированного с R-фикоэритрином (CD155-Fc-PE). Затем пятьдесят микролитров данного рабочего стокового раствора CD155-Fc-PE человека добавляли в лунки 96-луночного микропланшета с U-образным дном. В микропланшете получали 4x концентрированный промежуточный стоковый раствор каждой полиспецифической молекулы. Антитела серийно разбавляли в соотношении 1 к 3 буфером для FACS. Всего получали 11 рабочих разбавлений в диапазоне концентраций от 120 мкг/мл до 0,002 мкг/мл. Двадцать пять микролитров каждого разбавления добавляли в микропланшет, содержащий CD155-Fc-PE. Наконец, 25 мкл клеток CHO, экспрессирующих TIGIT человека, полученных как описано выше, добавляли в каждую лунку. После 30-минутной инкубации на льду клетки дважды промывали холодным буфером для FACS и клетки анализировали посредством проточной цитометрии (проточный цитометр BD LSR Fortessa). Данные анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo путем последовательного гейтирования по FSC-A относительно SSC-A и SSC-H относительно SSC-A. Рассчитывали средние значения интенсивности флуоресценции (MFI) для PE и данные наносили на график с помощью программного обеспечения GraphPad Prism и анализировали так, как описано выше. Для каждой концентрации полиспецифической молекулы экспериментальные данные подвергали нормализации с использованием значений MFI, полученных для клеток CHO, экспрессирующих TIGIT человека, инкубированных с CD155-Fc-PE в отсутствие полиспецифической молекулы, и значений MFI для аутофлуоресценции клеток CHO, экспрессирующих TIGIT человека (фон), в соответствии с уравнением 3.

Уравнение 3

% максимального сигнала =

$$\frac{(\text{MFI «полиспецифической молекулы»} - \text{MFI «фона»})}{(\text{«общая» MFI} - \text{MFI «фона»})},$$

где

«полиспецифическая молекула» представляет собой ВА123, ВА125, ВА127, ВА129, ВА130, ВА131, ВА133, ВА134 или ВА136,

«фон» обозначает только клетки (без антитела или CD155-Fc-PE),

«общая» обозначает клетки, инкубированные с CD155-Fc-PE в отсутствие антител

[00597] Определяли концентрацию полиспецифической молекулы, ингибирующую 50% (IC50) связывания CD155-Fc-PE с клетками СНО, экспрессирующими TIGIT и CD96 человека. Значения IC50 рассчитывали с применением программного обеспечения GraphPad Prism путем аппроксимации кривой с применением четырехпараметрического логистического уравнения.

[00598] Как показано на фигурах 13А-13I, ВА123, ВА125, ВА127, ВА133 и ВА136 блокировали связывание TIGIT и CD96 человека с CD155. ВА129, ВА130, ВА131 и ВА134 частично блокировали связывание TIGIT и CD96 человека с CD155. Средние значения IC50 рассчитывали для каждой полиспецифической молекулы, и они приведены в таблице 33. Площадь под кривой (AUC) рассчитывали для иллюстративного эксперимента, и она приведена в таблице 34.

Таблица 33. Значения IC50 для полиспецифических молекул к TIGITxCD96, блокирующих связывание клеток СНО, экспрессирующих TIGIT и CD96 человека, с CD155 человека.*

Полиспецифическая молекула	IC50 (среднее геометрическое значение), нг/мл
ВА123	111,6
ВА125	143,2
ВА127	141,2
ВА129	Не подходит
ВА130	Не подходит
ВА131	Не подходит
ВА133	266,6
ВА134	Не подходит
ВА136	113,7

*Рассчитано по результатам 2 экспериментов.

Таблица 34. Значения AUC для иллюстративного эксперимента, демонстрирующего, что полиспецифические молекулы к TIGITxCD96 блокируют

связывание клеток CHO, экспрессирующих TIGIT и CD96 человека, с CD155 человека.

Полиспецифическая молекула	Площадь под кривой (AUC)	Стандартная ошибка
BA123	209,2	2,406
BA125	213,0	3,209
BA127	217,1	2,936
BA128	448,9	N/A
BA129	399,1	4,603
BA130	432,1	7,002
BA131	447,6	3,035
BA133	254,2	N/A
BA134	428,1	N/A
BA136	204,6	N/A

8.6 Пример 6. Полиспецифические молекулы к TIGITxCD96 связываются с клетками, экспрессирующими FcγRIIIa человека

[00599] Способность полиспецифических молекул к TIGITxCD96 связываться с вариантом V/V или вариантом F/F FcγRIIIa человека на поверхности различных типов клеток тестировали *in vitro* посредством проточной цитометрии.

Связывание с клетками CHO, экспрессирующими FcγRIIIa человека

[00600] Оценивали способность полиспецифических молекул к TIGITxCD96 связываться с вариантом V/V или вариантом F/F FcγRIIIa человека, экспрессируемым на поверхности клеток CHO. Вкратце, клетки CHO трансфицировали вектором, кодирующим вариант V/V или F/F полноразмерного FcγRIIIa человека (клетки CHO, экспрессирующие FcγRIIIa человека), и отбирали клоны, стабильно экспрессирующие FcγRIIIa (вариант V/V или вариант F/F). Стабильные линии клеток культивировали в среде Power CHO-2, содержащей 4 mM L-глутамин, 100 ед./мл 100 ед./мл 1x НТ-добавки и 2,5 мкг/мл пурамицина.

[00601] Для анализа связывания антител замороженную аликвоту клеток CHO, экспрессирующих FcγRIIIa человека (вариант V/V или вариант F/F), размораживали при 37°C и затем переносили в пробирку, содержащую DPBS, дополненный 0,5% бычьего сывороточного альбумина и 0,05% азида натрия (буфер для FACS). Клетки центрифугировали при 300g в течение пяти минут. Супернатант удаляли, а клетки, ресуспендированные в буфере для FACS, высевали в 96-луночный планшет для тканевых культур с U-образным дном при плотности 2×10^5 клеток на лунку в 50 мкл. В отдельном микропланшете получали 2x концентрированный промежуточный стоковый раствор каждой полиспецифической молекулы. Полиспецифические молекулы серийно разбавляли в соотношении 1 к 4 буфером для FACS. Всего получали 11 рабочих

разбавлений в диапазоне концентраций от 60 мкг/мл до 0,000057 мкг/мл. Затем пятьдесят микролитров каждого разбавления переносили в микропланшет, содержащий клетки СНО, экспрессирующие FcγRIIIa человека (вариант V/V или вариант F/F). Затем клетки инкубировали в течение 45 минут при 4°C. Для окрашивания антител клетки дважды промывали холодным буфером для FACS и ресуспендировали в буфере для FACS, содержащем козий F(ab')₂-фрагмент от AffiniPure к IgG человека, меченный R-фикоэритрином (PE), со специфичностью к фрагменту Fcγ (Jackson, № по кат. 109-116-098), при конечном разбавлении 1:800. После 30-минутной инкубации на льду клетки дважды промывали холодным буфером для FACS и клетки анализировали посредством проточной цитометрии (проточный цитометр BD LSR Fortessa). Данные анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo путем последовательного гейтирования FSC-A относительно SSC-A и SSC-H относительно SSC-A. Рассчитывали средние значения интенсивности флуоресценции (MFI) для PE и данные наносили на график с помощью программного обеспечения GraphPad Prism. Данное программное обеспечение использовали для определения концентрации полиспецифической молекулы, приводящей к 50% от максимального связывания (эффективная концентрация 50, [EC50]), путем аппроксимации кривой с использованием четырехпараметрического логистического уравнения.

[00602] Как показано на фигурах 14A-14F (вариант V/V) и 15A-15F (вариант F/F), BA123, BA125, BA127, BA129, BA130 и BA131 связывались с клетками СНО, экспрессирующими FcγRIIIa человека, дозозависимым образом. Средние значения EC50 рассчитывали для каждой полиспецифической молекулы, и они приведены в таблице 35 для варианта V/V. Площадь под кривой (AUC) рассчитывали для иллюстративного эксперимента, и она приведена в таблицах 36 и 37 (для варианта V/V и варианта F/F соответственно).

Таблица 35. Значения EC50 для связывания полиспецифических молекул к TIGITxCD96 с клетками СНО, экспрессирующими FcγRIIIa человека (вариант V/V).*

Полиспецифическая молекула	EC50 (среднее геометрическое значение), нг/мл
BA123	188,8
BA125	153,3
BA127	147,8
BA129	126,5
BA130	118,4
BA131	123,6

*Рассчитано по результатам 2 экспериментов.

Таблица 36. Значения AUC для иллюстративного эксперимента, демонстрирующего связывание полиспецифических молекул к TIGITxCD96 с клетками СНО, экспрессирующими FcγRIIIa человека (вариант V/V).

Полиспецифическая молекула	Площадь под кривой (AUC)	Стандартная ошибка
BA123	36722	545,6
BA125	43351	167,6
BA127	35159	97,1
BA129	36957	317,6
BA130	44399	701,1
BA131	35486	267,1

Таблица 37. Значения AUC для эксперимента, демонстрирующего связывание полиспецифических молекул к TIGITxCD96 с клетками CHO, экспрессирующими FcγRIIa человека (вариант F/F).

Полиспецифическая молекула	Площадь под кривой (AUC)	Стандартная ошибка
BA123	27774	732
BA125	35798	426
BA127	28498	653
BA129	23351	695
BA130	29783	689
BA131	25318	434

8.7 Пример 7. Определение характеристик антител к CD96

8.7.1 Антитела к CD96 человека связываются с клетками, экспрессирующими CD96 человека и яванского макака (изоформу 2)

[00603] Способность антител к CD96 связываться с CD96 человека дикого типа или CD96 яванского макака дикого типа на поверхности различных типов клеток тестировали *in vitro* посредством проточной цитометрии.

Связывание с клетками CHO, экспрессирующими CD96 человека

[00604] Оценивали способность антител к CD96 связываться с CD96 человека дикого типа, экспрессируемым на поверхности клеток CHO. Вкратце, клетки CHO трансфицировали вектором, кодирующим изоформу 2 CD96 человека (клетки CHO, экспрессирующие CD96 человека), и отбирали клоны, стабильно экспрессирующие изоформу 2 CD96. Стабильные линии клеток культивировали в среде Power CHO-2, содержащей 4 mM L-глутамин, 100 ед./мл 1x НТ-добавки и 2,5 мкг/мл пурамицина.

[00605] Для анализа связывания антител замороженную аликвоту клеток CHO, экспрессирующих CD96 человека (изоформу 2), размораживали при 37°C и затем переносили в пробирку, содержащую DPBS, дополненный 0,5% бычьего сывороточного альбумина и 0,05% азида натрия (буфер для FACS). Клетки центрифугировали при 300g в течение пяти минут. Супернатант удаляли, а клетки, ресуспендированные в буфере для

FACS, высевали в 96-луночный планшет для тканевых культур с U-образным дном при плотности 2×10^5 клеток на лунку в 50 мкл. В отдельном микропланшете получали 2х концентрированный промежуточный стоковый раствор каждого антитела. Антитела серийно разбавляли в соотношении 1 к 4 буфером для FACS. Всего получали 11 рабочих разбавлений в диапазоне концентраций от 60 мкг/мл до 0,000057 мкг/мл. Затем пятьдесят микролитров каждого разбавления переносили в микропланшет, содержащий клетки СНО, экспрессирующие CD96 человека. Затем клетки инкубировали в течение 45 минут при 4°C. Для окрашивания антител клетки дважды промывали холодным буфером для FACS и ресуспендировали в буфере для FACS, содержащем козий F(ab')₂-фрагмент от AffiniPure к IgG человека, меченный R-фикоэритрином (PE), со специфичностью к фрагменту Fc γ (Jackson, № по кат. 109-116-098), при конечном разбавлении 1:800. После 30-минутной инкубации на льду клетки дважды промывали холодным буфером для FACS и клетки анализировали посредством проточной цитометрии (проточный цитометр BD LSR Fortessa). Данные анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo путем последовательного гейтирования FSC-A относительно SSC-A и SSC-H относительно SSC-A. Рассчитывали средние значения интенсивности флуоресценции (MFI) для PE и данные наносили на график с помощью программного обеспечения GraphPad Prism. Данное программное обеспечение использовали для определения концентрации антитела, приводящей к 50% от максимального связывания (эффективная концентрация 50, [EC50]), путем аппроксимации кривой с использованием четырехпараметрического логистического уравнения.

[00606] Как показано на фигурах 16А-16С, антитела к CD96 ВА143, ВА144 и ВА145 связывались с клетками СНО, экспрессирующими CD96 человека (изоформу 2), дозозависимым образом. Средние значения EC50 рассчитывали для каждого антитела, и они приведены в таблице 38. Площадь под кривой (AUC) рассчитывали для иллюстративного эксперимента, и она приведена в таблице 39.

Таблица 38. Значения EC50 для связывания антител к CD96 с клетками СНО, экспрессирующими CD96 человека (iso2).*

Полиспецифическая молекула	EC50 (среднее геометрическое значение), нг/мл
ВА143	5,9
ВА144	21,1
ВА145	26,7

*Рассчитано по результатам 2 экспериментов.

Таблица 39. Значения AUC для иллюстративного эксперимента, демонстрирующего связывание антител к CD96 с клетками СНО, экспрессирующими CD96 человека (iso2).

Полиспецифическая молекула	Площадь под кривой (AUC)	Стандартная ошибка
ВА143	215277	2774

Полиспецифическая молекула	Площадь под кривой (AUC)	Стандартная ошибка
BA144	236887	4647
BA145	225036	1556
BA146	2057	N/A

Связывание с клетками СНО, экспрессирующими CD96 яванского макака

[00607] В подобных экспериментах тестировали способность антител к CD96 связываться с клетками СНО, сконструированными для экспрессии CD96 яванского макака дикого типа (изоформы 2), на их клеточных поверхностях (клетки СНО, экспрессирующие CD96 яванского макака). Вкратце, клетки СНО трансфицировали вектором, кодирующим изоформу 2 CD96 яванского макака дикого типа, и отбирали клон, стабильно экспрессирующий CD96 яванского макака. Стабильную линию клеток культивировали в среде Power СНО-2, содержащей 4 мМ L-глутамин, 100 ед./мл 1х НТ-добавки и 2,5 мкг/мл пуромидина. Способность антител к CD96 связываться с клетками СНО, экспрессирующими CD96 яванского макака, определяли так, как описано выше для клеток СНО, экспрессирующих CD96 человека.

[00608] Как показано на фигурах 17А-17С, антитела к CD96 BA143 и BA145 связывались с клетками СНО, экспрессирующими CD96 яванского макака, дозозависимым образом. Средние значения EC50 для связывания антител к CD96 с клетками СНО, экспрессирующими CD96 яванского макака, рассчитывали для каждого антитела, и они приведены в таблице 40. Площадь под кривой (AUC) рассчитывали для иллюстративного эксперимента, и она приведена в таблице 41.

Таблица 40. Значения EC50 для связывания антител к CD96 с клетками СНО, экспрессирующими CD96 яванского макака.*

Полиспецифическая молекула	EC50 (среднее геометрическое значение), нг/мл
BA143	Не подходит
BA144	Связывание отсутствует
BA145	1046

*Рассчитано по результатам 2 экспериментов.

Таблица 41. Значения AUC для иллюстративного эксперимента демонстрирующего связывание антител к CD96 с клетками СНО, экспрессирующими CD96 яванского макака.

Полиспецифическая молекула	Площадь под кривой (AUC)	Стандартная ошибка
BA143	3675	144,9
BA144	862,3	11,65
BA145	4115	62,17

Полиспецифическая молекула	Площадь под кривой (AUC)	Стандартная ошибка
BA146	781,4	N/A

8.7.2 Антитела к CD96 человека блокируют связывание лиганда с CD96 человека
Блокирование связывания клеток CHO, экспрессирующих CD96 человека, с растворимым CD155 человека

[00609] В данном примере тестировали способность антител к CD96 блокировать связывание между CD96 человека дикого типа и его лигандом CD155 человека (также называемым PVR). В частности, антитела тестировали *in vitro* в отношении их способности блокировать связывание между CD96 человека (изоформой 2), сверхэкспрессируемым на клетках CHO, и растворимым CD155 человека, посредством проточной цитометрии.

[00610] Вкратце, в буфере для FACS получали раствор, содержащий 2 мкг/мл CD155-Fc человека, конъюгированного с R-фикоэритрином (CD155-Fc-PE). Затем пятьдесят микролитров данного рабочего стокового раствора CD155-Fc-PE человека добавляли в лунки 96-луночного микропланшета с U-образным дном. В микропланшете получали 4x концентрированный промежуточный стоковый раствор каждого антитела. Антитела серийно разбавляли в соотношении 1 к 4 буфером для FACS. Всего получали 11 рабочих разбавлений в диапазоне концентраций от 120 мкг/мл до 0,0001 мкг/мл. Двадцать пять микролитров каждого разбавления добавляли в микропланшет, содержащий CD155-Fc-PE. Наконец, 25 мкл клеток CHO, экспрессирующих CD96 человека (изоформу 2), полученных как описано выше, добавляли в каждую лунку. После 30-минутной инкубации на льду клетки дважды промывали холодным буфером для FACS и клетки анализировали посредством проточной цитометрии (проточный цитометр BD LSR Fortessa). Данные анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo путем последовательного гейтирования по FSC-A относительно SSC-A и SSC-H относительно SSC-A. Рассчитывали средние значения интенсивности флуоресценции (MFI) для PE и данные наносили на график с помощью программного обеспечения GraphPad Prism и анализировали так, как описано выше.

[00611] Для каждой концентрации антитела экспериментальные данные подвергали нормализации с использованием значений MFI, полученных для клеток CHO, экспрессирующих CD96 человека, инкубированных с CD155-Fc-PE в отсутствие антитела, и значений MFI для аутофлуоресценции клеток CHO, экспрессирующих CD96 человека (фон), в соответствии с уравнением 4.

Уравнение 4

% максимального сигнала =

$(\text{MFI «антитела»} - \text{MFI «фона»}) / (\text{«общая» MFI} - \text{MFI «фона»}),$

где

«антитело» обозначает BA143, BA144 или BA145,

«фон» обозначает только клетки (без антитела или CD155-Fc-PE),

«общая» обозначает клетки, инкубированные с CD155-Fc-PE в отсутствие антител

[00612] Определяли концентрацию антитела, ингибирующую 50% (IC50) связывания CD155-Fc-PE с клетками СНО, экспрессирующими CD96 человека. Значения IC50 рассчитывали с применением программного обеспечения GraphPad Prism путем аппроксимации кривой с применением четырехпараметрического логистического уравнения.

[00613] Как показано на фигурах 18А-18С, ВА143, ВА144 и ВА145 блокировали связывание клеток СНО, экспрессирующих CD96 человека, с CD155. Средние значения IC50 рассчитывали для каждого антитела, и они приведены в таблице 42. Площадь под кривой (AUC) рассчитывали для иллюстративного эксперимента, и она приведена в таблице 43.

Таблица 42. Значения IC50 для антител к CD96, блокирующих связывание клеток СНО, экспрессирующих CD96 человека (изоформу 2), с CD155 человека.*

Антитело	IC50 (среднее геометрическое значение), нг/мл
ВА143	152,4
ВА144	257,2
ВА145	542,1

*Рассчитано по результатам 3 экспериментов.

Таблица 43. Значения AUC для иллюстративного эксперимента, демонстрирующего, что антитела к CD96 блокируют связывание клеток СНО, экспрессирующих CD96 человека (изоформу 2), с CD155 человека.

Антитело	Площадь под кривой (AUC)	Стандартная ошибка
ВА143	357,2	3,61
ВА144	370,2	3,53
ВА145	401,7	2,58
ВА146	573,5	N/A

Блокирование связывания клеток СНО, экспрессирующих CD96 яванского макака, с растворимым CD155 человека

[00614] В подобных экспериментах тестировали способность антител к CD96 блокировать связывание между CD96 яванского макака дикого типа и его лигандом CD155 человека (также называемым PVR). Вкратце, антитела тестировали посредством проточной цитометрии *in vitro* в отношении их способности блокировать связывание между CD96 (изоформой 2) яванского макака дикого типа, сверхэкспрессируемым на клетках СНО, и растворимым CD155 человека, как описано для клеток СНО, экспрессирующих CD96 человека, выше.

[00615] Определяли концентрацию антитела, ингибирующую 50% (IC50) связывания CD155-Fc-PE с клетками СНО, экспрессирующими CD96 человека. Значения

IC50 рассчитывали с применением программного обеспечения GraphPad Prism путем аппроксимации кривой с применением четырехпараметрического логистического уравнения.

[00616] Как показано на фигурах 19А-19С, антитела к CD96 ВА145 блокируют и ВА143 частично блокирует взаимодействие между CD96 яванского макака и CD155. Средние значения IC50 рассчитывали для ВА145, и они приведены в таблице 44. Значение IC50 для ВА143 рассчитать невозможно вследствие частичного блокирования. Площадь под кривой (AUC) рассчитывали для иллюстративного эксперимента, и она приведена в таблице 45.

Таблица 44. Значения IC50 для антител к CD96, блокирующих связывание CD96 яванского макака (изоформа 2) с CD155 человека.*

Антитело	IC50 (среднее геометрическое значение), нг/мл
ВА143	Не подходит
ВА144	Блокирование отсутствует
ВА145	794,8

*Рассчитано по результатам 3 экспериментов.

Таблица 45. Значения AUC для иллюстративного эксперимента, демонстрирующего, что антитела к CD96 блокируют связывание CD96 яванского макака (изоформа 2) с CD155 человека.

Полиспецифическая молекула	Площадь под кривой (AUC)	Стандартная ошибка
ВА143	543,9	4,19
ВА144	569,5	4,70
ВА145	417,0	4,70
ВА146	567,0	N/A

8.8 Пример 8. Определение характеристик антител к TIGIT

8.8.1 Антитела к TIGIT человека связываются с клетками, экспрессирующими TIGIT человека и яванского макака

[00617] Способность антител к TIGIT связываться с TIGIT человека дикого типа или TIGIT яванского макака дикого типа на поверхности различных типов клеток тестировали *in vitro* посредством проточной цитометрии.

Связывание с клетками CHO, экспрессирующими TIGIT человека

[00618] Оценивали способность антител к TIGIT связываться с TIGIT человека дикого типа, экспрессируемым на поверхности клеток CHO. Вкратце, клетки CHO трансфицировали вектором, кодирующим TIGIT человека дикого типа (клетки CHO, экспрессирующие TIGIT человека), и отбирали клоны, стабильно экспрессирующие TIGIT. Стабильные линии клеток культивировали в среде Power CHO-2, содержащей 4 mM L-глутамин, 100 ед./мл 1x НТ-добавки и 2,5 мкг/мл пуромицина.

[00619] Для анализа связывания антител замороженную аликвоту клеток СНО, экспрессирующих TIGIT человека, размораживали при 37°C и затем переносили в пробирку, содержащую DPBS, дополненный 0,5% бычьего сывороточного альбумина и 0,05% азида натрия (буфер для FACS). Клетки центрифугировали при 300g в течение пяти минут. Супернатант удаляли, а клетки, ресуспендированные в буфере для FACS, высевали в 96-луночный планшет для тканевых культур с U-образным дном при плотности 2×10^5 клеток на лунку в 50 мкл. В отдельном микропланшете получали 2х концентрированный промежуточный стоковый раствор каждого антитела. Антитела серийно разбавляли в соотношении 1 к 4 буфером для FACS. Всего получали 11 рабочих разбавлений в диапазоне концентраций от 60 мкг/мл до 0,000057 мкг/мл. Затем пятьдесят микролитров каждого разбавления переносили в микропланшет, содержащий клетки СНО, экспрессирующие TIGIT человека. Затем клетки инкубировали в течение 45 минут при 4°C. Для окрашивания антител клетки дважды промывали холодным буфером для FACS и ресуспендировали в буфере для FACS, содержащем козий F(ab')₂-фрагмент от AffiniPure к IgG человека, меченный R-фикоэритрином (PE), со специфичностью к фрагменту Fc γ (Jackson, № по кат. 109-116-098), при конечном разбавлении 1:800. После 30-минутной инкубации на льду клетки дважды промывали холодным буфером для FACS и клетки анализировали посредством проточной цитометрии (проточный цитометр BD LSR Fortessa). Данные анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo путем последовательного гейтирования FSC-A относительно SSC-A и SSC-H относительно SSC-A. Рассчитывали средние значения интенсивности флуоресценции (MFI) для PE и данные наносили на график с помощью программного обеспечения GraphPad Prism. Данное программное обеспечение использовали для определения концентрации антитела, приводящей к 50% от максимального связывания (эффективная концентрация 50, [EC50]), путем аппроксимации кривой с использованием четырехпараметрического логистического уравнения.

[00620] Как показано на фигуре 20, BA148 связывался с клетками СНО, экспрессирующими TIGIT человека, дозозависимым образом. Средние значения EC50 рассчитывали для каждого антитела, и они приведены в таблице 46. Площадь под кривой (AUC) рассчитывали для иллюстративного эксперимента, и она приведена в таблице 47.

Таблица 46. Значения EC50 для связывания антител к TIGIT с клетками СНО, экспрессирующими TIGIT человека.*

Антитело	EC50 (среднее геометрическое значение), нг/мл
BA148	8,2

*Рассчитано по результатам 2 экспериментов.

Таблица 47. Значения AUC для иллюстративного эксперимента, демонстрирующего связывание антител к TIGIT с клетками СНО, экспрессирующими TIGIT человека.

Антитело	Площадь под кривой (AUC)	Стандартная ошибка
----------	--------------------------	--------------------

Антитело	Площадь под кривой (AUC)	Стандартная ошибка
BA148	297761	1286
BA149	653,3	49,26

Связывание с клетками CHO, экспрессирующими TIGIT яванского макака

[00621] В подобных экспериментах тестировали способность антител к TIGIT связываться с клетками CHO, сконструированными для экспрессии TIGIT яванского макака дикого типа, на их клеточных поверхностях (клетки CHO, экспрессирующие TIGIT яванского макака). Вкратце, клетки CHO трансфицировали вектором, кодирующим TIGIT яванского макака дикого типа, и отбирали клон, стабильно экспрессирующий TIGIT яванского макака. Стабильную линию клеток культивировали в среде Power CHO-2, содержащей 4 мМ L-глутамин, 100 ед./мл 1x НТ-добавки и 2,5 мкг/мл пуромицина. Способность антител к TIGIT связываться с клетками CHO, экспрессирующими TIGIT яванского макака, определяли так, как описано выше для клеток CHO, экспрессирующих TIGIT человека.

[00622] Как показано на фигуре 21, BA148 связывался с клетками CHO, экспрессирующими TIGIT яванского макака, дозозависимым образом. Средние значения EC50 для связывания BA148 с клетками CHO, экспрессирующими TIGIT яванского макака, рассчитывали для каждого антитела, и они приведены в таблице 48. Площадь под кривой (AUC) рассчитывали для иллюстративного эксперимента, и она приведена в таблице 49.

Таблица 48. Значения EC50 для связывания антител к TIGIT с клетками CHO, экспрессирующими TIGIT яванского макака.*

Антитело	EC50 (среднее геометрическое значение), нг/мл
BA148	53,42

*Рассчитано по результатам 2 экспериментов.

Таблица 49. Значения AUC для иллюстративного эксперимента, демонстрирующего связывание антител к TIGIT с клетками CHO, экспрессирующими TIGIT яванского макака.

Антитело	Площадь под кривой (AUC)	Стандартная ошибка
BA148	283737	1822
BA149	578,8	31,16

8.8.2 Антитела к TIGIT человека блокируют связывание лиганда с TIGIT

Блокирование связывания клеток CHO, экспрессирующих TIGIT человека, с растворимым CD155 человека

[00623] В данном примере тестировали способность антител к TIGIT блокировать связывание между TIGIT человека дикого типа и его лигандом CD155 человека (также называемым PVR). В частности, антитела тестировали *in vitro* в отношении их способности блокировать связывание между TIGIT человека дикого типа,

сверхэкспрессируемым на клетках CHO, и растворимым CD155 человека, посредством проточной цитометрии.

[00624] Вкратце, в буфере для FACS получали раствор, содержащий 2 мкг/мл CD155-Fc человека, конъюгированного с R-фикоэритрином (CD155-Fc-PE). Затем пятьдесят микролитров данного рабочего стокового раствора CD155-Fc-PE человека добавляли в лунки 96-луночного микропланшета с U-образным дном. В микропланшете получали 4х концентрированный промежуточный стоковый раствор каждого антитела. Антитела серийно разбавляли в соотношении 1 к 4 буфером для FACS. Всего получали 11 рабочих разбавлений в диапазоне концентраций от 120 мкг/мл до 0,0001 мкг/мл. Двадцать пять микролитров каждого разбавления добавляли в микропланшет, содержащий CD155-Fc-PE. Наконец, 25 мкл клеток CHO, экспрессирующих TIGIT человека, полученных как описано выше, добавляли в каждую лунку. После 30-минутной инкубации на льду клетки дважды промывали холодным буфером для FACS и клетки анализировали посредством проточной цитометрии (проточный цитометр BD LSR Fortessa). Данные анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo путем последовательного гейтирования по FSC-A относительно SSC-A и SSC-H относительно SSC-A. Рассчитывали средние значения интенсивности флуоресценции (MFI) для PE и данные наносили на график с помощью программного обеспечения GraphPad Prism и анализировали так, как описано выше.

[00625] Для каждой концентрации антитела экспериментальные данные подвергали нормализации с использованием значений MFI, полученных для клеток CHO, экспрессирующих TIGIT человека, инкубированных с CD155-Fc-PE в отсутствие антитела, и значений MFI для аутофлуоресценции клеток CHO, экспрессирующих TIGIT человека (фон), в соответствии с уравнением 5.

Уравнение 5

% максимального сигнала=

$(\text{MFI «антитела»} - \text{MFI «фона»}) / (\text{«общая» MFI} - \text{MFI «фона»}),$

где

«антитело» обозначает BA148,

«фон» обозначает только клетки (без антитела или CD155-Fc-PE),

«общая» обозначает клетки, инкубированные с CD155-Fc-PE в отсутствие антител

[00626] Определяли концентрацию антитела, ингибирующую 50% (IC50) связывания CD155-Fc-PE с клетками CHO, экспрессирующими TIGIT человека дикого типа. Значения IC50 рассчитывали с применением программного обеспечения GraphPad Prism путем аппроксимации кривой с применением четырехпараметрического логистического уравнения.

[00627] Как показано на фигуре 22, BA148 блокировал связывание TIGIT человека дикого типа с CD155. Средние значения IC50 рассчитывали для каждого антитела, и они приведены в таблице 50. Площадь под кривой (AUC) рассчитывали для иллюстративного эксперимента, и она приведена в таблице 51.

Таблица 50. Значения IC50 для антител к TIGIT, блокирующих связывание клеток СНО, экспрессирующих TIGIT человека, с CD155 человека.*

Антитело	IC50 (среднее геометрическое значение), нг/мл
BA148	8,4

*Расчитано по результатам 3 экспериментов.

Таблица 51. Значения AUC для иллюстративного эксперимента, демонстрирующего, что антитела к TIGIT блокируют связывание клеток СНО, экспрессирующих TIGIT человека, с CD155 человека.

Антитело	Площадь под кривой (AUC)	Стандартная ошибка
BA148	250,9	3,24
BA149	563,7	3,60

Блокирование связывания клеток СНО, экспрессирующих TIGIT яванского макака, с растворимым CD155 человека

[00628] В данном примере тестировали способность антител к TIGIT блокировать связывание между TIGIT яванского макака дикого типа и его лигандом CD155 человека (также называемым PVR). В частности, антитела тестировали *in vitro* в отношении их способности блокировать связывание между TIGIT яванского макака дикого типа, сверхэкспрессируемым на клетках СНО, и растворимым CD155 человека, посредством проточной цитометрии.

[00629] Вкратце, в буфере для FACS получали раствор, содержащий 2 мкг/мл CD155-Fc человека, конъюгированного с R-фикоэритрином (CD155-Fc-PE). Затем пятьдесят микролитров данного рабочего стокового раствора CD155-Fc-PE человека добавляли в лунки 96-луночного микропланшета с U-образным дном. В микропланшете получали 4х концентрированный промежуточный стоковый раствор каждой полиспецифической молекулы. Антитела серийно разбавляли в соотношении 1 к 4 буфером для FACS. Всего получали 11 рабочих разбавлений в диапазоне концентраций от 120 мкг/мл до 0,0001 мкг/мл. Двадцать пять микролитров каждого разбавления добавляли в микропланшет, содержащий CD155-Fc-PE. Наконец, 25 мкл клеток СНО, экспрессирующих TIGIT яванского макака, полученных как описано выше, добавляли в каждую лунку. После 30-минутной инкубации на льду клетки дважды промывали холодным буфером для FACS и клетки анализировали посредством проточной цитометрии (проточный цитометр BD LSR Fortessa). Данные анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo путем последовательного гейтирования по FSC-A относительно SSC-A и SSC-H относительно SSC-A. Рассчитывали средние значения интенсивности флуоресценции (MFI) для PE и данные наносили на график с помощью программного обеспечения GraphPad Prism и анализировали так, как описано выше.

[00630] Как показано на фигуре 23, BA148 блокировал связывание клеток СНО, экспрессирующих TIGIT яванского макака, с CD155. Средние значения IC50

рассчитывали для каждого антитела, и они приведены в таблице 52. Площадь под кривой (AUC) рассчитывали для иллюстративного эксперимента, и она приведена в таблице 53.

Таблица 52. Значения IC50 для антител к TIGIT, блокирующих связывание клеток СНО, экспрессирующих TIGIT яванского макака, с CD155 человека.

Антитело	IC50 (среднее геометрическое значение), нг/мл
BA148	243,1

*Расчитано по результатам 3 экспериментов.

Таблица 53. Значения AUC для иллюстративного эксперимента, демонстрирующего, что антитела к TIGIT блокируют связывание клеток СНО, экспрессирующих TIGIT яванского макака, с CD155 человека.

Антитело	Площадь под кривой (AUC)	Стандартная ошибка
BA148	359,9	3,18
BA149	543,4	3,59

8.9 Пример 9. Антитела к TIGIT человека и к CD96 человека связываются с клетками, экспрессирующими варианты V/V и F/F FcγRIIIa

[00631] Способность антител к TIGIT и к CD96 связываться с FcγRIIIa человека (вариантом V/V и вариантом F/F) на поверхности различных типов клеток тестировали *in vitro* посредством проточной цитометрии.

Связывание с клетками СНО, экспрессирующими FcγRIIIa человека

[00632] Оценивали способность антител к TIGIT и к CD96 связываться с FcγRIIIa человека, экспрессируемым на поверхности клеток СНО. Вкратце, клетки СНО трансфицировали вектором, кодирующим вариант V/V или вариант F/F FcγRIIIa человека (клетки СНО, экспрессирующие FcγRIIIa человека), и отбирали клоны, стабильно экспрессирующие вариант V/V или вариант F/F FcγRIIIa. Стабильные линии клеток культивировали в среде Power СНО-2, содержащей 4 мМ L-глутамин, 100 ед./мл 1х НТ-добавки и 2,5 мкг/мл пуромицина.

[00633] Для анализа связывания антител замороженную аликвоту клеток СНО, экспрессирующих FcγRIIIa человека (вариант V/V или вариант F/F), размораживали при 37°C и затем переносили в пробирку, содержащую DPBS, дополненный 0,5% бычьего сывороточного альбумина и 0,05% азида натрия (буфер для FACS). Клетки центрифугировали при 300g в течение пяти минут. Супернатант удаляли, а клетки, ресуспендированные в буфере для FACS, высевали в 96-луночный планшет для тканевых культур с U-образным дном при плотности 2×10^5 клеток на лунку в 50 мкл. В отдельном микропланшете получали 2х концентрированный промежуточный стоковый раствор каждого антитела. Антитела серийно разбавляли в соотношении 1 к 4 буфером для FACS. Всего получали 11 рабочих разбавлений в диапазоне концентраций от 60 мкг/мл до 0,000057 мкг/мл. Затем пятьдесят микролитров каждого разбавления переносили в микропланшет, содержащий клетки СНО, экспрессирующие FcγRIIIa человека (вариант V/V или вариант F/F). Затем клетки инкубировали в течение 45 минут при 4°C. Для

окрашивания антител клетки дважды промывали холодным буфером для FACS и ресуспендировали в буфере для FACS, содержащем козий F(ab')₂-фрагмент от AffiniPure к IgG человека, меченный R-фикоэритрином (PE), со специфичностью к фрагменту Fcγ (Jackson, № по кат. 109-116-098), при конечном разбавлении 1:800. После 30-минутной инкубации на льду клетки дважды промывали холодным буфером для FACS и клетки анализировали посредством проточной цитометрии (проточный цитометр BD LSR Fortessa). Данные анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo путем последовательного гейтирования FSC-A относительно SSC-A и SSC-H относительно SSC-A. Рассчитывали средние значения интенсивности флуоресценции (MFI) для PE и данные наносили на график с помощью программного обеспечения GraphPad Prism. Данное программное обеспечение использовали для определения концентрации антитела, приводящей к 50% от максимального связывания (эффективная концентрация 50, [EC50]), путем аппроксимации кривой с использованием четырехпараметрического логистического уравнения.

[00634] Как показано на фигурах 24A-24D, BA143, BA144, BA145 и BA148 связывались с клетками CHO, экспрессирующими вариант V/V FcγRIIIa человека, дозозависимым образом. Средние значения EC50 рассчитывали для каждого антитела, и они приведены в таблице 54. Площадь под кривой (AUC) рассчитывали для иллюстративного эксперимента, и она приведена в таблице 55.

[00635] Как показано на фигурах 25A-25E, BA143, BA144 и BA148 связывались с клетками CHO, экспрессирующими вариант F/F FcγRIIIa человека, дозозависимым образом. Значения EC50 рассчитывали для каждого антитела, и они приведены в таблице 56. Рассчитывали площадь под кривой (AUC), и она приведена в таблице 57.

Таблица 54. Значения EC50 для связывания антител к TIGIT и к CD96 с клетками CHO, экспрессирующими FcγRIIIa человека (V/V).*

Антитело	EC50, нг/мл
BA143	191,5
BA144	271,7
BA145	329,1
BA148	45,5

*Рассчитано по результатам 2 экспериментов.

Таблица 55. Значения AUC для иллюстративного эксперимента, демонстрирующего связывание антител к TIGIT и к CD96 с клетками CHO, экспрессирующими FcγRIIIa человека (V/V).

Антитело	Площадь под кривой (AUC)
BA143	28879
BA144	38938
BA145	29559

Антитело	Площадь под кривой (AUC)
BA148	50127

Таблица 56. Значения EC50 для связывания антител к TIGIT и к CD96 с клетками СНО, экспрессирующими FcγRIIIa человека (F/F).

Антитело	EC50, нг/мл
BA143	Не подходит
BA144	Не подходит
BA145	Не подходит
BA148	2,62

*Расчитано по результатам 1 эксперимента.

Таблица 57. Значения AUC для эксперимента, демонстрирующего связывание антител к TIGIT и к CD96 с клетками СНО, экспрессирующими FcγRIIIa человека (F/F).

Антитело	Площадь под кривой (AUC)
BA143	10043
BA144	14171
BA145	3333
BA148	66622

8.10 Пример 10. Связывание полиспецифических молекул к TIGITxCD96 с первичными Т-клетками человека

[00636] В данном примере тестировали способность полиспецифической молекулы к TIGITxCD96 BA127, а также моноспецифического контрольного антитела к CD96 BA143, моноспецифического антитела к TIGIT BA148 или биспецифического изотипического контрольного антитела BA128 связываться с активированными Т-клетками человека. В случае активированных Т-клеток замороженную аликвоту РВМС человека от четырех разных здоровых доноров извлекали из жидкого азота и немедленно размораживали в воде при 37°C до появления плавающего льда. Затем клетки переносили в 10 мл предварительно нагретой среды R10. Удаляли 20 мкл и добавляли к 380 мкл красителя для определения жизнеспособности для подсчета клеток и проверки жизнеспособности с применением прибора Muse. Образцы центрифугировали при 1200 об./мин в течение пяти минут и затем суспендировали до конечной концентрации 1×10^6 клеток/мл в среде R10. Клетки стимулировали активатором Т-клеток immunoCult CD3/CD28 при 25 мкл на 1×10^6 клеток и пипеткой вносили 100 мкл стимулированных клеток в каждую лунку 96-луночного круглодонного планшета для тканевых культур и инкубировали при 37°C в 5% CO₂ в течение четырех дней.

[00637] Помещали диапазон доз полиспецифической молекулы или антитела в 96-луночный круглодонный планшет. Сначала получали 200 мкл каждого антитела с концентрацией 50 мкг/мл в буфере. Затем полиспецифическую молекулу и антитела

серийно разбавляли в соотношении 1 к 10 путем переноса пипеткой 20 мкл предыдущего разбавления в 180 мкл буфера для образцов. Всего получали 8 разбавлений в диапазоне от 50 мкг/мл до 0,000005 мкг/мл. Через четыре дня планшеты с образцами центрифугировали в течение двух минут при 2000 об./мин и супернатанты удаляли. Образцы блокировали с помощью блокирующего раствора для FcγR, полученного в буфере для FACS, из расчета 5 мкл на 100 мкл тестируемого материала в течение 10 минут. Затем планшеты с образцами центрифугировали в течение двух минут при 2000 об./мин и удаляли супернатант. Затем клетки ресуспендировали в 100 мкл полиспецифической молекулы к TIGITxCD96 или соответствующего изотипического контроля в концентрациях, показанных на фигурах 26А-26F. 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 удаляли. Данную промывку повторяли еще один раз.

[00638] Затем клетки ресуспендировали в смеси флуоресцентно меченных антител. Смесь флуоресцентно меченных антител, достаточную для всех образцов, получали в буфере для FACs. Затем 100 мкл антитела на лунку добавляли в круглодонный 96-луночный планшет. Планшет с образцами инкубировали в течение 20 минут на льду. Клетки промывали путем добавления холодного буфера для образцов, центрифугировали в течение двух минут при 2000 об./мин и супернатанты удаляли. Данную промывку повторяли еще один раз. Получали конечную смесь PE-меченного вторичного антитела к IgG человека в 11 мл буфера для FACs. Добавляли 100 мкл вторичного антитела на лунку в круглодонный 96-луночный планшет. 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 удаляли. Данную промывку повторяли еще один раз.

[00639] Связывание антител измеряли посредством 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 с помощью каждого отдельного антитела, 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, CD4 относительно CD8 и SSC относительно CD25. Рассчитывали среднюю интенсивность флуоресценции (MFI).

[00640] Как показано на фигурах 26А-26F, полиспецифическая молекула к TIGITxCD96 BA127 демонстрировала сильное связывание с активированными первичными CD4+ Т-клетками человека (фигуры 26А, 26В и 26С) и активированными

первичными CD8⁺ Т-клетками человека (фигуры 26D, 256 и 26F) у трех независимых доноров. Примечательно, что ВА127 демонстрировал более высокое максимальное связывание с активированными CD4⁺ (фигуры 26А и 26В) и CD8⁺ (фигуры 26D и 26Е) Т-клетками от доноров 1 и 2 по сравнению с соответствующим моноспецифическим контрольным антителом к CD96 ВА143 и моноспецифическим антителом к TIGIT ВА148. ВА127 демонстрировал сопоставимое связывание с активированными CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетками от донора 3 по сравнению с ВА143 (фигуры 26С и 26F).

8.11 Пример 11. Связывание полиспецифических молекул к TIGITxCD96 с первичными Т-клетками человека

[00641] В данном эксперименте тестировали способность полиспецифической молекулы к TIGITxCD96 ВА127 связываться с активированными Т-клетками человека. В случае активированных Т-клеток замороженную аликвоту РВМС человека от четырех разных здоровых доноров извлекали из жидкого азота и немедленно размораживали в воде при 37°C до появления плавающего льда. Затем клетки переносили в 10 мл предварительно нагретой среды R10. Удаляли 20 мкл и добавляли к 380 мкл красителя для определения жизнеспособности для подсчета клеток и проверки жизнеспособности с применением прибора Muse. Образцы центрифугировали при 1200 об./мин в течение пяти минут и затем суспендировали до конечной концентрации 1×10^6 клеток/мл в среде R10. Клетки стимулировали активатором Т-клеток immunoCult CD3/CD28 при 25 мкл на 1×10^6 клеток и пипеткой вносили 100 мкл стимулированных клеток в каждую лунку 96-луночного круглодонного планшета для тканевых культур и инкубировали при 37°C в 5% CO₂ в течение четырех дней.

[00642] Помещали диапазон доз полиспецифической молекулы или антитела (ВА127 или биспецифического изотипического контрольного антитела ВА128) в 96-луночный круглодонный планшет. Сначала получали 200 мкл каждого антитела с концентрацией 25 мкг/мл в буфере. Затем полиспецифическую молекулу и антитело серийно разбавляли в соотношении 1 к 4 путем переноса пипеткой 50 мкл предыдущего разбавления в 150 мкл буфера для образцов. Всего получали 8 разбавлений в диапазоне от 50 мкг/мл до 0,000005 мкг/мл. Через четыре дня планшеты с образцами центрифугировали в течение двух минут при 2000 об./мин и супернатанты удаляли. Образцы блокировали с помощью блокирующего раствора для FcγR, полученного в буфере для FACs, из расчета 5 мкл на 100 мкл тестируемого материала в течение 10 минут. Затем планшеты с образцами центрифугировали в течение двух минут при 2000 об./мин и удаляли супернатант. Затем клетки ресуспендировали в 100 мкл полиспецифической молекулы к TIGITxCD96 (ВА127) или соответствующего изотипического контроля (ВА128) в концентрациях, показанных на фигурах 27А-27F. 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 удаляли. Данную промывку повторяли еще один раз.

[00643] Затем клетки ресуспендировали в смеси флуоресцентно меченных антител.

Смесь флуоресцентно меченных антител, достаточную для всех образцов, получали в буфере для FACs. Затем 100 мкл антитела на лунку добавляли в круглодонный 96-луночный планшет. Планшет с образцами инкубировали в течение 20 минут на льду. Клетки промывали путем добавления холодного буфера для образцов, центрифугировали в течение двух минут при 2000 об./мин и супернатанты удаляли. Данную промывку повторяли еще один раз. Получали конечную смесь PE-меченного вторичного антитела к IgG человека в 11 мл буфера для FACs. Добавляли 100 мкл вторичного антитела на лунку в круглодонный 96-луночный планшет. 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 удаляли. Данную промывку повторяли еще один раз.

[00644] Связывание антител измеряли посредством 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 с помощью каждого отдельного антитела, 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, CD4 относительно CD8 и SSC относительно CD25. Рассчитывали среднюю интенсивность флуоресценции (MFI).

[00645] Как показано на фигурах 27A-27F, полиспецифическая молекула TIGITxCD96 BA127 связывалась с активированными первичными CD4⁺ Т-клетками человека (фигуры 27A, 27B и 27C) и активированными первичными CD8⁺ Т-клетками человека (фигуры 27D, 27E и 27F) от трех независимых доноров дозозависимым образом.

8.12 Пример 12. Анализ стимуляции с помощью SEA

[00646] В данном примере тестировали способность полиспецифических молекул к TIGITxCD96 по сравнению с контрольными полиспецифическими молекулами облегчать секрецию цитокина интерлейкина-2 (IL-2) PBMC, стимулированными SEA.

[00647] Диапазон доз каждой из полиспецифических молекул к TIGITxCD96 BA123, BA125 и BA127, изотипической контрольной полиспецифической молекулы BA128 и контрольных полиспецифических молекул к CD96 изотипа х, BA129, BA130 и BA131, получали в 5х концентрированном промежуточном стоковом растворе в микроцентрифужных пробирках объемом 1,2 мл. Сначала получали 250 мкг/мл промежуточного стокового раствора в среде R10 и антитела серийно разбавляли в соотношении 1 к 10 последовательным разбавлением с общим количеством разбавлений, составляющим 8. Добавляли 20 мкл антитела на лунку в круглодонный 96-луночный планшет для получения конечной концентрации, находящейся в диапазоне от 50 мкг/мл

до 0,000005 мкг/мл.

[00648] Замороженные аликвоты РВМС человека извлекали из жидкого азота и немедленно размораживали в воде при 37°C до тех пор, пока не наблюдалось появление плавающего льда. Клетки переносили в 10 мл предварительно нагретой среды R10 и немедленно центрифугировали при 1500 об./мин в течение пяти минут. Супернатант удаляли 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.

[00649] 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 и 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.

[00650] 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 получали путем внесения пипеткой 2,5 мл 10x буфера для иммуноанализа AlphaLISA в 22,5 мл воды. Аналит IL-2 человека использовали для получения стандартного разбавления. В буфере для анализа получали смесь 1,6x акцепторных гранул AlphaLISA для связывания IL-2 и биотинилированного антитела к IL-2. Добавляли 8 мкл в каждую лунку и инкубировали в темноте при комнатной температуре. Планшеты AlphaLISA кратковременно центрифугировали при 2000 об./мин. В буфере для анализа получали 2,3x промежуточный стоковый раствор донорных гранул со стрептавидином. В каждую лунку вносили 10 мкл и инкубировали в темноте при комнатной температуре. Планшеты AlphaLISA кратковременно центрифугировали при 2000 об./мин. На планшет-ридере EnVision измеряли относительные световые единицы (RLU) с применением протокола AlphaScreen. Результаты наносили на график в GraphPad Prism и кривые аппроксимировали с применением нелинейной регрессии.

[00651] Как показано на фигурах 28A-28C, полиспецифические молекулы к TIGITxCD96 BA123, BA125, и BA127 (фигура 28A), и BA125, и BA127 (фигура 28B) сильно повышали восприимчивость T-клеток, определенную по секреции цитокина интерлейкина-2 (IL-2), по сравнению с изотипическим контролем BA128. Дополнительно, BA127 демонстрировал более высокую функциональную активность по сравнению с полиспецифическими молекулами BA129, BA130 и BA131, связывающими только CD96, или изотипическим контрольным антителом BA128 (фигура 28C).

8.13 Пример 13. Анализ стимуляции с помощью SEA

[00652] Диапазон доз каждого из полиспецифической молекулы к TIGITxCD96 BA127, изотипической контрольной полиспецифической молекулы BA128, моноспецифического контрольного антитела к CD96 BA143 и моноспецифического контрольного антитела к TIGIT BA148 получали в 5х концентрированном промежуточном стоковом растворе в микроцентрифужных пробирках объемом 1,2 мл. Сначала получали 250 мкг/мл промежуточного стокового раствора в среде R10 и антитела серийно разбавляли в соотношении 1 к 10 последовательным разбавлением с общим количеством разбавлений, составляющим 8. Добавляли 20 мкл антитела на лунку в круглодонный 96-луночный планшет для получения конечной концентрации, находящейся в диапазоне от 50 мкг/мл до 0,000005 мкг/мл.

[00653] Замороженные аликвоты РВМС человека извлекали из жидкого азота и немедленно размораживали в воде при 37°C до тех пор, пока не наблюдалось появление плавающего льда. Клетки переносили в 10 мл предварительно нагретой среды R10 и немедленно центрифугировали при 1500 об./мин в течение пяти минут. Супернатант удаляли 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.

[00654] 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 и 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.

[00655] 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 получали путем внесения пипеткой 2,5 мл 10х буфера для иммуноанализа AlphaLISA в 22,5 мл воды. Аналит IL-2 человека использовали для получения стандартного разбавления. В буфере для анализа получали смесь 1,6х акцепторных гранул AlphaLISA для связывания IL-2 и биотинилированного антитела к IL-2. Добавляли 8 мкл в каждую лунку и инкубировали в темноте при комнатной температуре. Планшеты AlphaLISA кратковременно центрифугировали при 2000 об./мин. В буфере для анализа получали 2,3х промежуточный стоковый раствор донорных гранул со стрептавидином. В каждую лунку вносили 10 мкл и инкубировали в темноте при комнатной температуре. Планшеты AlphaLISA кратковременно центрифугировали при 2000 об./мин. На планшет-

ридере EnVision измеряли относительные световые единицы (RLU) с применением протокола AlphaScreen. Результаты наносили на график в GraphPad Prism и кривые аппроксимировали с применением нелинейной регрессии.

[00656] Как показано на фигуре 29, полиспецифическая молекула к TIGITxCD96 BA127 сильно повышала восприимчивость Т-клеток, определенную по секреции цитокина интерлейкина-2 (IL-2), по сравнению с изотипической контролем BA128. Дополнительно, BA127 демонстрировал более высокую функциональную активность по сравнению с моноспецифическим антителом к TIGIT BA148 или моноспецифическим антителом к CD96 BA143.

8.14 Пример 14. Анализ стимуляции с помощью SEA

[00657] Диапазон доз каждой из полиспецифической молекулы к TIGITxCD96 BA127 и изотипической контрольной полиспецифической молекулы BA128 получали в 5х концентрированном промежуточном стоковом растворе в микроцентрифужных пробирках объемом 1,2 мл. В случае доноров 1 и 2 получали 250 мкг/мл промежуточного стокового раствора в среде R10 и антитела серийно разбавляли в соотношении 1 к 10 последовательным разбавлением с общим количеством разбавлений, составляющим 8. Добавляли 20 мкл антитела на лунку в круглодонный 96-луночный планшет для получения конечной концентрации, находящейся в диапазоне от 50 мкг/мл до 0,000005 мкг/мл.

[00658] В случае доноров 3, 4, 5 и 6 получали промежуточный исходный раствор с концентрацией 10 мкг/мл в среде R10, а затем антитела серийно разбавляли в соотношении 1 к 5 посредством серийного разбавления. Всего получали 8 разбавлений в среде R10 в диапазоне от 10 мкг/мл до 0,000128 мкг/мл. Добавляли 20 мкл антитела на лунку в круглодонный 96-луночный планшет.

[00659] Замороженные аликвоты РВМС человека извлекали из жидкого азота и немедленно размораживали в воде при 37°C до тех пор, пока не наблюдалось появление плавающего льда. Клетки переносили в 10 мл предварительно нагретой среды R10 и немедленно центрифугировали при 1500 об./мин в течение пяти минут. Супернатант удаляли 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.

[00660] 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 и 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.

[00661] 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 получали путем внесения пипеткой 2,5 мл 10х буфера для иммуноанализа AlphaLISA в 22,5 мл воды. Аналит IL-2 человека использовали для получения стандартного разбавления. В буфере для анализа получали смесь 1,6х акцепторных гранул AlphaLISA для связывания IL-2 и биотинилированного антитела к IL-2. Добавляли 8 мкл в каждую лунку и инкубировали в темноте при комнатной температуре. Планшеты AlphaLISA кратковременно центрифугировали при 2000 об./мин. В буфере для анализа получали 2,3х промежуточный стоковый раствор донорных гранул со стрептавидином. В каждую лунку вносили 10 мкл и инкубировали в темноте при комнатной температуре. Планшеты AlphaLISA кратковременно центрифугировали при 2000 об./мин. На планшет-ридере EnVision измеряли относительные световые единицы (RLU) с применением протокола AlphaScreen. Результаты наносили на график в GraphPad Prism и кривые аппроксимировали с применением нелинейной регрессии.

[00662] Как показано на фигурах 30A-309F, полиспецифическая молекула к TIGITxCD96 BA127 сильно повышала восприимчивость T-клеток, определенную по секреции интерлейкина-2 (IL-2) SEA-стимулированными PBMC от шести отдельных доноров дозозависимым образом, по сравнению с изотипическим контролем BA128. Значения EC10, EC50 и EC90 для каждого донора на фигуре 30 перечислены в таблице 58.

Таблица 58. Значения EC10, EC50 и EC90.

Донор	EC10	EC50	EC90
1	0,002519	0,02267	0,204
2	0,002114	0,01908	0,1713
3	0,0183	0,09746	0,8771
4	0,0003820	0,003438	0,03094
5	0,001937	0,01743	0,1569
6	0,001954	0,01758	0,1583
Среднее значение	0,0045	0,0296	0,2664

8.15 Пример 15. Репортерный анализ блокирования TIGIT

[00663] Данный пример демонстрирует способность полиспецифических молекул к TIGITxCD96 блокировать передачу ингибирующего сигнала TIGIT/CD155.

[00664] Репортерный анализ блокирования TIGIT проводили в соответствии с протоколом производителя (Promega). Сначала эффекторные T-клетки Jurkat, сконструированные для экспрессии TIGIT человека, с люциферазным репортером, управляемым нативным промотором, который способен отвечать как на активацию TCR, так и на костимуляцию CD226, извлекали из жидкого азота и немедленно размораживали

в воде при 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. Суспензию клеток осторожно перемешивали и переносили в стерильный резервуар и 80 мкл суспензии клеток переносили во внутренние 60 лунок 96-луночного белого аналитического планшета с плоским дном. В каждую из внешних лунок планшетов для анализа добавляли 120 мкл предварительно нагретого (37°C) буфера для анализа. Затем клетки инкубировали в течение 16-20 часов в инкубаторе при 37°C, 5% CO₂.

[00665] Диапазоны доз полиспецифических молекул к TIGITxCD96 BA125 и BA127, изотипической контрольной полиспецифической молекулы BA128, контрольной полиспецифической молекулы к TIGIT изотипа х, BA133, контрольного моноспецифического антитела к CD96 BA143, контрольной полиспецифической молекулы к CD96 изотипа х, BA131, моноспецифического изотипического контроля BA146, эталонного антитела 1 к TIGIT, эталонного антитела 2 к TIGIT и эталонного антитела 3 к TIGIT получали в 6х концентрированном промежуточном стоковом растворе в микроцентрифужных пробирках объемом 1,2 мл. Сначала получали промежуточный исходный раствор с концентрацией 50 мкг/мл в буфере для анализа, а затем антитела серийно разбавляли в соотношении 1 к 2,5 посредством серийного разбавления. Всего получали 10 разбавлений в буфере для анализа в диапазоне от 50 мкг/мл до 0,0131 мкг/мл (фигура 31А и 31В) или от 40 мкг/мл до 0,0262 мкг/мл (фигура 31С). Добавляли 20 мкл антитела на лунку к предварительно высеванным эффекторным клеткам, экспрессирующим TIGIT.

[00666] Клетки СНО-К1, сконструированные для экспрессии CD155 человека, со сконструированным белком клеточной поверхности (клетки CD155 aAPC/СНО-К1), предназначенным для активации комплекса TCR антиген-независимым образом, извлекали из жидкого азота и немедленно размораживали в воде при 37°C до появления плавающего льда. Затем клетки переносили в коническую пробирку объемом 15 мл, содержащую 3 мл буфера для анализа. Суспензию клеток осторожно перемешивали и переносили в стерильный резервуар и 20 мкл суспензии клеток переносили к предварительно высеванным эффекторным клеткам, экспрессирующим TIGIT, и смеси антител. Конечный объем для анализа составлял 120 мкл.

[00667] Затем клетки инкубировали в течение 6 часов в инкубаторе при 37°C, 5% CO₂. После инкубации аналитические планшеты извлекали из инкубатора и оставляли для уравнивания до температуры окружающей среды в течение 10 минут. Затем добавляли 120 мкл реагента Bio-Glo™ к предварительно высеванным клеткам и смеси полиспецифических молекул или антител и инкубировали 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.

[00668] Как показано на фигурах 31А, 31В и 31С, полиспецифические молекулы к TIGITxCD96 BA125 и BA127 значительно усиливали экспрессию гена люциферазы, суррогат для активации Т-клеточного рецептора (TCR) и костимулирующий путь активации CD226 дозозависимым образом в результате блокады лиганда TIGIT-CD155. Как и ожидалось, контрольная полиспецифическая молекула к TIGIT изотипа х, BA133, но не контрольное моноспецифическое антитело к CD96 BA143, также усиливала экспрессию гена люциферазы. По сравнению с эталонными контрольными полиспецифическими молекулами к TIGIT изотипа х, BA125 и BA127 демонстрировали сопоставимую способность усиливать репортерную активность.

8.16 Пример 16. Полиспецифические молекулы к TIGITxCD96 вызывают секрецию IL-2 в анализе стимуляции Т-клеток

[00669] В данном примере оценивали способность полиспецифической молекулы к TIGITxCD96 BA127 вызывать секрецию цитокина IL-2 в первичных РВМС человека от здорового донора, стимулированных субоптимальной концентрацией суперантигена SEA.

[00670] Диапазон доз BA127, эталонного моноклонального эталонного антитела 1 к TIGIT или изотипической контрольной полиспецифической молекулы BA128 получали в 5х концентрированном промежуточном стоковом растворе в микроцентрифужных пробирках объемом 1,2 мл. Сначала получали 50 мкг/мл промежуточного стокового раствора в среде R10 и антитела серийно разбавляли в соотношении 1 к 5 последовательным разбавлением с общим количеством разбавлений, составляющим 8. Добавляли 20 мкл антитела на лунку в круглодонный 96-луночный планшет для получения конечной концентрации, находящейся в диапазоне от 10 мкг/мл до 0,000128 мкг/мл.

[00671] Замороженные аликвоты РВМС человека извлекали из жидкого азота и немедленно размораживали в воде при 37°C до тех пор, пока не наблюдалось появление плавающего льда. Клетки переносили в 10 мл предварительно нагретой среды R10 и немедленно центрифугировали при 1500 об./мин в течение пяти минут. Супернатант удаляли 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.

[00672] 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 и 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.

[00673] 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 получали путем внесения пипеткой 2,5 мл 10x буфера для иммуноанализа AlphaLISA в 22,5 мл воды. Аналит IL-2 человека использовали для получения стандартного разбавления. В буфере для анализа получали смесь 1,6x акцепторных гранул AlphaLISA для связывания IL-2 и биотинилированного антитела к IL-2. Добавляли 8 мкл в каждую лунку и инкубировали в темноте при комнатной температуре. Планшеты AlphaLISA кратковременно центрифугировали при 2000 об./мин. В буфере для анализа получали 2,3x промежуточный стоковый раствор донорных гранул со стрептавидином. В каждую лунку вносили 10 мкл и инкубировали в темноте при комнатной температуре. Планшеты AlphaLISA кратковременно центрифугировали при 2000 об./мин. На планшет-ридере EnVision измеряли относительные световые единицы (RLU) с применением протокола AlphaScreen. Результаты наносили на график в GraphPad Prism и кривые аппроксимировали с применением нелинейной регрессии.

[00674] Как показано на фигурах 32A и 32B, полиспецифическая молекула к TIGITxCD96 BA127 приводила к более высоким уровням секреции цитокина IL-2 по сравнению с эталонным антителом к TIGIT и изотипическим контрольным антителом у двух доноров в диапазоне концентраций.

8.17 Пример 17. Полиспецифические молекулы к TIGITxCD96 ингибировали рост опухоли в доклинической модели опухоли мыши

[00675] Данный пример продемонстрировал, что блокада полиспецифическими молекулами к TIGITxCD96 стимулирует более высокий контроль опухоли по сравнению с соответствующими моносспецифическими антителами и комбинациями моносспецифических антител в мышинной модели.

[00676] Мышиные суррогатные моносспецифические антитела к TIGIT и к CD96 и полиспецифические молекулы к TIGITxCD96 тестировали на модели колоректальной карциномы мыши. В частности, мышей Balb/c (Jackson Labs, №000651) в возрасте 6-8 недель сначала акклиматизировали в течение двух недель, а затем брили и метили. Клетки колоректальной карциномы мыши CT26 (ATCC® CRL-2638™) размножали в тканевой культуре в среде RPMI, дополненной 10% термоинактивированной FBS и нормоцином, в течение 1 недели. Мышам путем подкожной инъекции вводили 1×10^5 клеток CT26, суспендированных в 100 PBS. Обеспечивали приживание имплантированных опухолевых клеток в течение 9-10 дней до достижения размера примерно 50 мм^3 . Затем мышей рандомизировали и обрабатывали с помощью 200 мкг суррогатного антитела к TIGIT mIgG_{2a} (клон: 10A7), суррогатного антитела к CD96 mIgG_{2a} (клон: 6A6), комбинации суррогатных mAb к TIGIT и к CD96, суррогатной полиспецифической молекулы к TIGITxCD96 mIgG_{2a}, суррогатной полиспецифической молекулы к TIGITxCD96 mIgG_{2a}.N297A, изотипического контрольного моносспецифического антитела (mIgG_{2a}) или изотипической контрольной полиспецифической молекулы (mIgG_{2a}) два раза в неделю

путем внутрибрюшинного введения в течение 2 недель. Объемы опухоли измеряли штангенциркулем один раз в две недели и рассчитывали как $0,5 \times \text{длина} \times \text{ширина}^2$.

[00677] Как показано на фигурах 33А-33Е, суррогатная полиспецифическая молекула к TIGITxCD96 mIgG_{2a} привела к полному ответу у 13 из 15 мышей. Напротив, суррогатная полиспецифическая молекула mIgG_{2a}-N297А к TIGITxCD96 не влияла на контроль роста опухоли. Полиспецифическая молекула к TIGITxCD96 mIgG_{2a} демонстрировала более высокий контроль опухоли по сравнению с терапией одним средством с mAb к TIGIT или mAb к CD96 или комбинацией mAb к TIGIT и CD96. Данный результат подтвердил наблюдение *in vitro* о том, что полиспецифические молекулы к TIGITxCD96 зависят от совместного взаимодействия с FcγR для усиления иммунной эффекторной функции и функционально превосходят моноспецифические антитела или комбинацию моноспецифических антител.

8.18 Пример 18. Совместное взаимодействие с FcγR имеет решающее значение для противоопухолевого иммунитета

[00678] Данный пример продемонстрировал способность полиспецифических молекул к TIGITxCD96 ингибировать рост опухоли в доклинической модели опухоли мыши.

[00679] Мышиные суррогатные моноспецифические антитела к TIGIT и к CD96 и полиспецифические молекулы к TIGITxCD96 тестировали на модели колоректальной карциномы мыши. В частности, мышей Balb/c (Jackson Labs, №000651) в возрасте 6-8 недель сначала акклиматизировали в течение двух недель, а затем брили и метили. Клетки колоректальной карциномы мыши CT26 (ATCC® CRL-2638™) размножали в тканевой культуре в среде RPMI, дополненной 10% термоинактивированной FBS и нормоцином, в течение 1 недели. Мышам путем подкожной инъекции вводили 1×10^5 клеток CT26, суспендированных в 100 PBS. Обеспечивали приживание имплантированных опухолевых клеток в течение 9-10 дней до достижения размера примерно 50 мм³. Затем мышей рандомизировали и обрабатывали с помощью 200 мкг суррогатного антитела к TIGIT mIgG_{2a} (клон: 10A7), суррогатного антитела к CD96 mIgG_{2a} (клон: 6A6), комбинации суррогатных моноспецифических антител к TIGIT и к CD96, суррогатного антитела к TIGITxCD96 mIgG_{2a}, биспецифической суррогатной полиспецифической молекулы к TIGITxCD96 mIgG_{2a}.N297A, изотипического контрольного антитела (mIgG_{2a}) или изотипической контрольной полиспецифической молекулы (mIgG_{2a}) два раза в неделю путем внутрибрюшинного введения в течение 2 недель. Объемы опухоли измеряли штангенциркулем один раз в две недели и рассчитывали как $0,5 \times \text{длина} \times \text{ширина}^2$.

[00680] Как показано на фигурах 34А-34Е, суррогатная полиспецифическая молекула к TIGITxCD96 mIgG_{2a} привела к полному ответу у 13 из 15 мышей. Напротив, суррогатная полиспецифическая молекула mIgG_{2a}-N297А к TIGITxCD96 не влияла на контроль роста опухоли. Полиспецифическая молекула к TIGITxCD96 mIgG_{2a} демонстрировала более высокий контроль опухоли по сравнению с терапией одним средством с моноспецифическим антителом к TIGIT или моноспецифическим антителом к

CD96 или комбинацией моноспецифических антител к TIGIT и CD96. Данный результат подтвердил наблюдение *in vitro* о том, что полиспецифические молекулы к TIGITxCD96 зависят от совместного взаимодействия с FcγR для усиления иммунной эффекторной функции и функционально превосходят mAb или комбинацию mAb.

[00681] 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.

[00682] 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.

[00683] Под объем представленной далее формулы изобретения подпадают и другие варианты осуществления.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полиспецифическая молекула, содержащая:

(а) первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 человека, при этом первая антигенсвязывающая область содержит первую VH, содержащую CDR CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и первую VL, содержащую CDR CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где

(i) первая VH содержит аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из аминокислотной последовательности VH под SEQ ID NO: 34, и первая VL содержит аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из аминокислотной последовательности VL под SEQ ID NO: 35,

(ii) первая VH содержит аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из аминокислотной последовательности VH под SEQ ID NO: 36, и первая VL содержит аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из аминокислотной последовательности VL под SEQ ID NO: 37,

(iii) первая VH содержит аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из аминокислотной последовательности VH под SEQ ID NO: 38, и первая VL содержит аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из аминокислотной последовательности VL под SEQ ID NO: 39, и

(б) вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96 человека, при этом вторая антигенсвязывающая область содержит вторую VH, содержащую CDR CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и вторую VL, содержащую CDR CDRL1, CDRL2 и CDRL3.

2. Полиспецифическая молекула по п. 1, где CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 первой антигенсвязывающей области содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13, 14 и 15; 16, 17, 18, 19, 20 и 21; или 22, 23, 24, 25, 26 и 27 соответственно.

3. Полиспецифическая молекула по п. 1 или п. 2, где вторая антигенсвязывающая область специфически связывается с TIGIT человека.

4. Полиспецифическая молекула по любому из предыдущих пунктов, где вторая VH содержит аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из аминокислотной последовательности VH под SEQ ID NO: 40, и вторая VL содержит аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из аминокислотной последовательности VL под SEQ ID NO: 41.

5. Полиспецифическая молекула по п. 4, где CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 второй антигенсвязывающей области содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 28, 29, 30, 31, 32 и 33 соответственно.

6. Полиспецифическая молекула, содержащая:

(а) первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT человека, при этом первая антигенсвязывающая область

содержит первую VH, содержащую CDR CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и первую VL, содержащую CDR CDRL1, CDRL2 и CDRL3, и

(b) вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT человека, при этом вторая антигенсвязывающая область содержит вторую VH, содержащую аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из аминокислотной последовательности VH под SEQ ID NO: 40, и вторую VL, содержащую аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из аминокислотной последовательности VL под SEQ ID NO: 41.

7. Полиспецифическая молекула по п. 6, где CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 второй антигенсвязывающей области содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 28, 29, 30, 31, 32 и 33 соответственно.

8. Полиспецифическая молекула по п. 6 или п. 7, где первая антигенсвязывающая область специфически связывается с CD96 человека.

9. Полиспецифическая молекула по любому из предыдущих пунктов, где первая VH содержит аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 34, 36 или 38.

10. Полиспецифическая молекула по п. 9, где аминокислотная последовательность первой VH состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 34, 36 или 38.

11. Полиспецифическая молекула по любому из предыдущих пунктов, где первая VL содержит аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 35, 37 или 39.

12. Полиспецифическая молекула по п. 11, где аминокислотная последовательность первой VL состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 35, 37 или 39.

13. Полиспецифическая молекула по любому из предыдущих пунктов, где вторая VH содержит аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 40.

14. Полиспецифическая молекула по п. 13, где аминокислотная последовательность второй VH состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 40.

15. Полиспецифическая молекула по любому из предыдущих пунктов, где вторая VL содержит аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 41.

16. Полиспецифическая молекула по п. 15, где аминокислотная последовательность второй VL состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 41.

17. Полиспецифическая молекула, содержащая:

(a) первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 человека, при этом антигенсвязывающая область содержит первую VH и первую

VL, где первая VH содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34, 36 или 38, и/или первая VL содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 35, 37 или 39, и

(b) вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96 человека, при этом вторая антигенсвязывающая область содержит вторую VH и вторую VL.

18. Выделенная полиспецифическая молекула по п. 17, где вторая антигенсвязывающая область специфически связывается с TIGIT человека.

19. Полиспецифическая молекула, содержащая:

(a) первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT человека, при этом первая антигенсвязывающая область содержит первую VH и первую VL, и

(b) вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT человека, при этом антигенсвязывающая область содержит вторую VH и вторую VL, где вторая VH содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 40, и/или вторая VL содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 41.

20. Выделенная полиспецифическая молекула по п. 19, где первая антигенсвязывающая область специфически связывается с CD96 человека.

21. Полиспецифическая молекула по любому из пп. 17-20, где первая VH содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34, 36 или 38, и первая VL содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 35, 37 или 39.

22. Полиспецифическая молекула по п. 21, где аминокислотная последовательность первой VH состоит из SEQ ID NO: 34, 36 или 38, и аминокислотная последовательность первой VL состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 35, 37 или 39.

23. Полиспецифическая молекула по любому из пп. 17-22, где первая VH и первая VL содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 34 и 35; 36 и 37 или 38 и 39 соответственно.

24. Полиспецифическая молекула по п. 23, где аминокислотные последовательности первой VH и первой VL состоят из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 34 и 35; 36 и 37 или 38 и 39 соответственно.

25. Полиспецифическая молекула по любому из пп. 17-24, где вторая VH содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 40, и вторая VL содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 41.

26. Полиспецифическая молекула по п. 25, где аминокислотные последовательности второй VH и второй VL состоят из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 40 и 41 соответственно.

27. Полиспецифическая молекула по любому из пп. 17-26, где первая VH и первая VL содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 34 и 35; 36 и 37 или 38 и 39 соответственно, и вторая VH и вторая VL содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 40 и 41 соответственно.

28. Полиспецифическая молекула по п. 27, где аминокислотные последовательности первой VH и первой VL состоят из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 34 и 35; 36 и 37 или 38 и 39 соответственно, и аминокислотные последовательности второй VH и второй VL состоят из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 40 и 41 соответственно.

29. Полиспецифическая молекула по любому из предыдущих пунктов, где первая и/или вторая антигенсвязывающие области содержат константную область тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂ человека.

30. Полиспецифическая молекула по п. 29, где константная область тяжелой цепи представляет собой константную область тяжелой цепи IgG₁.

31. Полиспецифическая молекула по п. 30, где константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 49-60.

32. Полиспецифическая молекула по п. 30, где аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG₁ содержит мутацию N297A, пронумерованную в соответствии с системой нумерации EU.

33. Полиспецифическая молекула по любому из предыдущих пунктов, где первая и/или вторая антигенсвязывающие области содержат 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.

34. Полиспецифическая молекула по п. 33, где FcγR представляет собой FcγRIIB или FcγRIIA.

35. Полиспецифическая молекула по п. 30, где аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG₁ содержит мутации S267E и L328F, пронумерованные в соответствии с системой нумерации EU.

36. Полиспецифическая молекула по п. 30, где аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG₁ содержит по меньшей мере одну мутацию, выбранную из группы, состоящей из S239D, A330L и I332E, пронумерованных в соответствии с системой нумерации EU.

37. Полиспецифическая молекула по любому из предыдущих пунктов, где:

(a) первая антигенсвязывающая область содержит первую константную область тяжелой цепи, содержащую аспарат в аминокислотном положении 239; аспарат и глутамат в аминокислотных положениях 239 и 332 соответственно или аспарат, лейцин и глутамат в аминокислотных положениях 239, 330 и 332 соответственно, и

(b) вторая антигенсвязывающая область содержит вторую константную область тяжелой цепи, которая не содержит аспарат, лейцин и глутамат в аминокислотных положениях 239, 330 и 332 соответственно,

где аминокислотные положения пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU.

38. Полиспецифическая молекула по п. 37, где первая константная область тяжелой цепи и вторая константная область тяжелой цепи содержат SEQ ID NO: 58 и 57; 59 и 57 или 60 и 57 соответственно.

39. Полиспецифическая молекула по любому из пп. 1-36, где:

(a) первая антигенсвязывающая область содержит первую константную область тяжелой цепи, содержащую аспартат и глутамат в аминокислотных положениях 239 и 332 соответственно или аспартат, лейцин и глутамат в аминокислотных положениях 239, 330 и 332 соответственно, и

(b) вторая антигенсвязывающая область содержит вторую константную область тяжелой цепи, содержащую аспартат в аминокислотных положениях 239,

где аминокислотные положения пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU.

40. Полиспецифическая молекула по п. 39, где первая константная область тяжелой цепи и вторая тяжелая цепь и константная область содержат SEQ ID NO: 59 и 58; или 60 и 58 соответственно.

41. Полиспецифическая молекула по п. 39, где:

(a) первая константная область тяжелой цепи содержит аспартат, лейцин и глутамат в аминокислотных положениях 239, 330 и 332 соответственно, и

(b) вторая константная область тяжелой цепи дополнительно содержит глутамат в аминокислотном положении 332,

где аминокислотные положения пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU.

42. Полиспецифическая молекула по п. 41, где первая константная область тяжелой цепи и вторая константная область тяжелой цепи содержат SEQ ID NO: 60 и 59 соответственно.

43. Полиспецифическая молекула по любому из пп. 1-36, где:

(a) первая антигенсвязывающая область содержит первую константную область тяжелой цепи, которая не содержит аспартат, лейцин и глутамат в аминокислотных положениях 239, 330 и 332 соответственно, и

(b) вторая антигенсвязывающая область содержит вторую константную область тяжелой цепи, содержащую аспартат в аминокислотном положении 239; аспартат и глутамат в аминокислотных положениях 239 и 332 соответственно или аспартат, лейцин и глутамат в аминокислотных положениях 239, 330 и 332 соответственно,

где аминокислотные положения пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU.

44. Полиспецифическая молекула по п. 43, где первая константная область тяжелой цепи и вторая константная область тяжелой цепи содержат SEQ ID NO: 57 и 60; 57 и 59 или 57 и 58 соответственно.

45. Полиспецифическая молекула по любому из пп. 1-36, где:

(a) первая антигенсвязывающая область содержит первую константную область тяжелой цепи, содержащую аспарат в аминокислотных положениях 239, и

(b) вторая антигенсвязывающая область содержит вторую константную область тяжелой цепи, содержащую аспарат и глутамат в аминокислотных положениях 239 и 332 соответственно или аспарат, лейцин и глутамат в аминокислотных положениях 239, 330 и 332 соответственно,

где аминокислотные положения пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU.

46. Полиспецифическая молекула по п. 45, где первая константная область тяжелой цепи и вторая константная область тяжелой цепи содержат SEQ ID NO: 58 и 60 или 58 и 59 соответственно.

47. Полиспецифическая молекула по п. 45, где:

(a) первая константная область тяжелой цепи дополнительно содержит глутамат в аминокислотном положении 332, и

(b) вторая константная область тяжелой цепи содержит аспарат, лейцин и глутамат в аминокислотных положениях 239, 330 и 332 соответственно,

где аминокислотные положения пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU.

48. Полиспецифическая молекула по п. 47, где первая константная область тяжелой цепи и вторая константная область тяжелой цепи содержат SEQ ID NO: 59 и 60 соответственно.

49. Полиспецифическая молекула по любому из пп. 1-48, где:

(a) первая антигенсвязывающая область содержит первую константную область тяжелой цепи, содержащую триптофан в аминокислотном положении 366, и

(b) вторая антигенсвязывающая область содержит вторую константную область тяжелой цепи, содержащую серин, аланин и валин в аминокислотных положениях 366, 368 и 407 соответственно,

где аминокислотные положения пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU.

50. Полиспецифическая молекула по п. 49, где первая константная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 53, 54, 55 или 56, и вторая константная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 49, 50, 51 или 52.

51. Полиспецифическая молекула по любому из пп. 1-48, где:

(a) первая антигенсвязывающая область содержит первую константную область тяжелой цепи, содержащую серин, аланин и валин в аминокислотных положениях 366, 368 и 407 соответственно, и

(b) вторая антигенсвязывающая область содержит вторую константную область тяжелой цепи, содержащую триптофан в аминокислотном положении 366,

где аминокислотные положения пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU.

52. Полиспецифическая молекула по п. 51, где первая константная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 49, 50, 51 или 52, и вторая константная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 53, 54, 55 или 56.

53. Полиспецифическая молекула по любому из предыдущих пунктов, где первая антигенсвязывающая область содержит первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, 3, 5 или 67-99.

54. Полиспецифическая молекула по п. 53, где аминокислотная последовательность первой тяжелой цепи состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1, 3, 5 или 67-99.

55. Полиспецифическая молекула по любому из предыдущих пунктов, где вторая антигенсвязывающая область содержит вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7 или 100-110.

56. Полиспецифическая молекула по п. 55, где аминокислотная последовательность второй тяжелой цепи состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 7 или 100-110.

57. Полиспецифическая молекула по любому из предыдущих пунктов, где полиспецифическая молекула содержит константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 42, 43 или 44.

58. Полиспецифическая молекула по любому из предыдущих пунктов, где первая антигенсвязывающая область содержит первую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2, 4 или 6.

59. Полиспецифическая молекула по п. 58, где аминокислотная последовательность первой легкой цепи состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2, 4 или 6.

60. Полиспецифическая молекула по любому из предыдущих пунктов, где вторая антигенсвязывающая область содержит вторую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8 или 9.

61. Полиспецифическая молекула по п. 60, где аминокислотная последовательность второй легкой цепи состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 8 или 9.

62. Полиспецифическая молекула, содержащая:

(а) первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 человека, при этом первая антигенсвязывающая область содержит первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, 3, 5 или 67-99, и/или первую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2, 4 или 6, и

(б) вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от CD96 человека, при этом вторая антигенсвязывающая область содержит вторую тяжелую цепь и вторую легкую цепь.

63. Полиспецифическая молекула по п. 58, где вторая антигенсвязывающая область специфически связывается с TIGIT человека.

64. Полиспецифическая молекула, содержащая:

(а) первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с антигеном, отличным от TIGIT человека, при этом первая антигенсвязывающая область содержит первую тяжелую цепь и первую легкую цепь, и

(б) вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT человека, при этом вторая антигенсвязывающая область содержит вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7 или 100-110, и/или вторую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8 или 9.

65. Полиспецифическая молекула по п. 64, где первая антигенсвязывающая область специфически связывается с CD96 человека.

66. Полиспецифическая молекула по любому из пп. 62-65, где первая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, 3, 5 или 67-99, и/или первая легкая цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2, 4 или 6.

67. Полиспецифическая молекула по любому из пп. 62-66, где первая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, 3, 5 или 67-99; и первая легкая цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2, 4 или 6.

68. Полиспецифическая молекула по п. 67, где аминокислотная последовательность первой тяжелой цепи состоит из SEQ ID NO: 1, 3, 5 или 67-99, и аминокислотная последовательность первой легкой цепи состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 2, 4 или 6.

69. Полиспецифическая молекула по любому из пп. 62-68, где вторая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7 или 100-110, и/или вторая легкая цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8 или 9.

70. Полиспецифическая молекула по любому из пп. 62-69, где вторая тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7 или 100-110, и вторая легкая цепь содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8 или 9.

71. Полиспецифическая молекула по п. 70, где аминокислотная последовательность второй тяжелой цепи состоит из SEQ ID NO: 7, и аминокислотная последовательность второй легкой цепи состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 8 или 9.

72. Полиспецифическая молекула по любому из пп. 62-71, где первая тяжелая цепь и первая легкая цепь содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 1 и 2; 3 и 4 или 5 и 6 соответственно, и/или вторая тяжелая цепь и вторая легкая цепь содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 7 и 8 или 7 и 9 соответственно.

73. Полиспецифическая молекула по любому из пп. 62-72, где первая тяжелая цепь и первая легкая цепь содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 1 и 2; 3 и 4 или 5 и 6 соответственно, и вторая тяжелая цепь и вторая легкая цепь содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 7 и 8 или 7 и 9 соответственно.

74. Полиспецифическая молекула по п. 73, где аминокислотные последовательности первой тяжелой цепи и первой легкой цепи состоят из SEQ ID NO: 1 и 2; 3 и 4 или 5 и 6 соответственно, и аминокислотные последовательности второй тяжелой цепи и второй легкой цепи состоят из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 7 и 8 или 7 и 9 соответственно.

75. Полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 человека, и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT человека, где:

(а) первая антигенсвязывающая область содержит аспарат, лейцин, глутамат и триптофан в аминокислотных положениях 239, 330, 332 и 366 соответственно, и

(б) вторая антигенсвязывающая область содержит серин, аланин и валин в аминокислотных положениях 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аспарат, лейцин и глутамат в аминокислотных положениях 239, 330 и 332 соответственно,

где аминокислотные положения пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU.

76. Полиспецифическая молекула по п. 75, где первая антигенсвязывающая область содержит SEQ ID NO: 73, 84, 95 или 56, и вторая антигенсвязывающая область содержит SEQ ID NO: 103 или 49.

77. Полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 человека, и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT человека, где:

(а) первая антигенсвязывающая область содержит аспарат, лейцин, глутамат и триптофан в аминокислотных положениях 239, 330, 332 и 366 соответственно, и

(б) вторая антигенсвязывающая область содержит аспарат, серин, аланин и валин в аминокислотных положениях 239, 366, 368 и 407 соответственно,

где аминокислотные положения пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU.

78. Полиспецифическая молекула по п. 77, где первая антигенсвязывающая область содержит SEQ ID NO: 73, 84, 95 или 56, и вторая антигенсвязывающая область содержит SEQ ID NO: 104 или 50.

79. Полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 человека, и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT человека, где:

(а) первая антигенсвязывающая область содержит серин, аланин и валин в аминокислотных положениях 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аспарат, лейцин и глутамат в аминокислотных положениях 239, 330 и 332 соответственно, и

(b) вторая антигенсвязывающая область содержит аспарат, лейцин, глутамат и триптофан в аминокислотных положениях 239, 330, 332 и 366 соответственно, где аминокислотные положения пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU.

80. Полиспецифическая молекула по п. 79, где первая антигенсвязывающая область содержит SEQ ID NO: 67, 78, 89 или 49, и вторая антигенсвязывающая область содержит SEQ ID NO: 7 или 56.

81. Полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 человека, и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT человека, где:

(a) первая антигенсвязывающая область аспарат, серин, аланин и валин в аминокислотных положениях 239, 366, 368 и 407 соответственно, и

(b) вторая антигенсвязывающая область содержит аспарат, лейцин, глутамат и триптофан в аминокислотных положениях 239, 330, 332 и 366 соответственно,

где аминокислотные положения пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU.

82. Полиспецифическая молекула по п. 81, где первая антигенсвязывающая область содержит SEQ ID NO: 1, 3, 5 или 50, и вторая антигенсвязывающая область содержит SEQ ID NO: 7 или 56.

83. Полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 человека, и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT человека, где:

(a) первая антигенсвязывающая область содержит аспарат, глутамат и триптофан в аминокислотных положениях 239, 332 и 366 соответственно, и

(b) вторая антигенсвязывающая область содержит серин, аланин и валин в аминокислотных положениях 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аспарат, лейцин и глутамат в аминокислотных положениях 239, 330 и 332 соответственно,

где аминокислотные положения пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU.

84. Полиспецифическая молекула по п. 83, где первая антигенсвязывающая область содержит SEQ ID NO: 72, 83, 94 или 55, и вторая антигенсвязывающая область содержит SEQ ID NO: 103 или 49.

85. Полиспецифическая молекула, содержащая первую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с CD96 человека, и вторую антигенсвязывающую область, которая специфически связывается с TIGIT человека, где:

(a) первая антигенсвязывающая область содержит серин, аланин и валин в аминокислотных положениях 366, 368 и 407 соответственно, но не содержит аспарат, лейцин и глутамат в аминокислотных положениях 239, 330 и 332 соответственно, и

(b) вторая антигенсвязывающая область содержит аспарат, глутамат и триптофан в аминокислотных положениях 239, 332 и 366 соответственно,

где аминокислотные положения пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU.

86. Полиспецифическая молекула по п. 85, где первая антигенсвязывающая область содержит SEQ ID NO: 67, 78, 89 или 49, и вторая антигенсвязывающая область содержит SEQ ID NO: 102 или 55.

87. Выделенное антитело, которое специфически связывается с TIGIT человека, при этом антитело содержит: VH, содержащую аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 из аминокислотной последовательности VH под SEQ ID NO: 40, и VL, содержащую аминокислотные последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3 из аминокислотной последовательности VL под SEQ ID NO: 41.

88. Выделенное антитело по п. 87, где антитело содержит аминокислотные последовательности CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 под SEQ ID NO: 28, 29, 30, 31, 32 и 33 соответственно.

89. Выделенное антитело по п. 87 или п. 88, где антитело содержит аминокислотную последовательность VH под SEQ ID NO: 40.

90. Выделенное антитело по п. 89, где аминокислотная последовательность VH состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 40.

91. Выделенное антитело по любому из пп. 87-90, где антитело содержит аминокислотную последовательность VL под SEQ ID NO: 41.

92. Выделенное антитело по п. 91, где аминокислотная последовательность VL состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 41.

93. Выделенное антитело, которое специфически связывается с TIGIT человека, при этом антитело содержит VH и VL, содержащие аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 40 и 41 соответственно.

94. Выделенное антитело по п. 87, где аминокислотные последовательности VH и VL состоят из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 40 и 41 соответственно.

95. Выделенное антитело по любому из пп. 87-94, где антитело содержит константную область тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂ человека.

96. Выделенное антитело по п. 95, где антитело содержит константную область тяжелой цепи IgG₁.

97. Выделенное антитело по п. 96, где антитело содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 57, 58, 59 или 60.

98. Выделенное антитело по п. 96, где аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG₁ содержит мутацию N297A, пронумерованную в соответствии с системой нумерации EU.

99. Выделенное антитело по любому из пп. 87-98, где антитело содержит константную область тяжелой цепи, которая является вариантом константной области

тяжелой цепи дикого типа, где вариант константной области тяжелой цепи связывается с Fc γ R с большей аффинностью, чем константная область тяжелой цепи дикого типа связывается с Fc γ R.

100. Выделенное антитело по п. 99, где Fc γ R представляет собой Fc γ R1B или Fc γ R3A.

101. Выделенное антитело по п. 96, где аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG₁ содержит мутации S267E и L328F, пронумерованные в соответствии с системой нумерации EU.

102. Выделенное антитело по п. 96, 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.

103. Выделенное антитело по любому из пп. 87-102, где антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 107, 108, 109 или 110.

104. Выделенное антитело по п. 103, где аминокислотная последовательность тяжелой цепи состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 107, 108, 109 или 110.

105. Выделенное антитело по любому из пп. 87-104, где антитело содержит константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 43 или 44.

106. Выделенное антитело по любому из пп. 87-104, где антитело содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8 или 9.

107. Выделенное антитело по п. 106, где аминокислотная последовательность легкой цепи состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 8 или 9.

108. Выделенное антитело, которое специфически связывается с TIGIT человека, при этом антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 107, 108, 109 или 110, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8 или 9.

109. Выделенное антитело по п. 108, где аминокислотная последовательность тяжелой цепи состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 107, 108, 109 или 110, и аминокислотная последовательность легкой цепи состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 8 или 9.

110. Выделенное антитело по п. 108 или п. 109, где тяжелая цепь и легкая цепь содержат аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 107 и 8; 107 и 9; 108 и 8; 108 и 9; 109 и 8; 109 и 9; 110 и 8 или 110 и 9 соответственно.

111. Выделенное антитело по п. 110, где аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи состоят из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 107 и 8; 107 и 9; 108 и 8; 108 и 9; 109 и 8; 109 и 9; 110 и 8 или 110 и 9 соответственно.

112. Выделенное антитело по любому из пп. 87-111, где антитело является полиспецифическим.

113. Полиспецифическая молекула или выделенное антитело по любому из предыдущих пунктов, где полиспецифическая молекула или выделенное антитело конъюгированы с цитотоксическим средством, цитостатическим средством, токсином, радионуклидом или выявляемой меткой.

114. Полиспецифическая молекула или выделенное антитело по любому из предыдущих пунктов, где полиспецифическая молекула или выделенное антитело конъюгированы с антителом.

115. Выделенный полинуклеотид, кодирующий:

(a) VH, VL, тяжелую цепь и/или легкую цепь полиспецифической молекулы по любому из пп. 1-86, п. 113 или п. 114;

(b) первую VH и первую VL полиспецифической молекулы по любому из пп. 1-86, п. 113 или п. 114;

(c) вторую VH и вторую VL полиспецифической молекулы по любому из пп. 1-86, п. 113 или п. 114;

(d) первую тяжелую цепь и первую легкую цепь полиспецифической молекулы по любому из пп. 1-86, п. 113 или п. 114;

(e) вторую тяжелую цепь и вторую легкую цепь полиспецифической молекулы по любому из пп. 1-86, п. 113 или п. 114.

116. Выделенный полинуклеотид, кодирующий VH и/или VL или тяжелую цепь и/или легкую цепь выделенного антитела по любому из пп. 87-114.

117. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 115.

118. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 116.

119. Рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая:

(a) полинуклеотид по п. 115;

(b) вектор по п. 117;

(c) первый полинуклеотид, кодирующий VH и VL первой антигенсвязывающей области по любому из пп. 1-86, п. 113 или п. 114, и второй полинуклеотид, кодирующий VH и VL второй антигенсвязывающей области по любому из пп. 1-86, п. 113 или п. 114;

(d) первый вектор, содержащий первый полинуклеотид, кодирующий VH и VL первой антигенсвязывающей области по любому из пп. 1-86, п. 113 или п. 114, и второй вектор, содержащий второй полинуклеотид, кодирующий VH и VL второй антигенсвязывающей области по любому из пп. 1-86, п. 113 или п. 114;

(e) первый полинуклеотид, кодирующий VH первой антигенсвязывающей области по любому из пп. 1-86, п. 113 или п. 114, второй полинуклеотид, кодирующий VL первой антигенсвязывающей области по любому из пп. 1-86, п. 113 или п. 114, третий полинуклеотид, кодирующий VH второй антигенсвязывающей области по любому из пп. 1-86, п. 113 или п. 114, и четвертый полинуклеотид, кодирующий VL второй антигенсвязывающей области по любому из пп. 1-86, п. 113 или п. 114;

(f) первый вектор, содержащий первый полинуклеотид, кодирующий VH первой антигенсвязывающей области по любому из пп. 1-86, п. 113 или п. 114, второй вектор, содержащий второй полинуклеотид, кодирующий VL первой антигенсвязывающей области по любому из пп. 1-86, п. 113 или п. 114, третий вектор, содержащий третий полинуклеотид, кодирующий VH второй антигенсвязывающей области по любому из пп. 1-86, п. 113 или п. 114, и четвертый вектор, содержащий четвертый полинуклеотид, кодирующий VL второй антигенсвязывающей области по любому из пп. 1-86, п. 113 или п. 114;

(g) первый полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь и легкую цепь первой антигенсвязывающей области по любому из пп. 53-56 или пп. 58-74, и второй полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь и легкую цепь второй антигенсвязывающей области по любому из пп. 53-56 или пп. 58-74;

(h) первый вектор, содержащий первый полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь и легкую цепь первой антигенсвязывающей области по любому из пп. 53-56 или пп. 58-74, и второй вектор, содержащий второй полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь и легкую цепь второй антигенсвязывающей области по любому из пп. 53-56 или пп. 58-74;

(i) первый полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь первой антигенсвязывающей области по любому из пп. 53-56 или пп. 58-74, второй полинуклеотид, кодирующий легкую цепь первой антигенсвязывающей области по любому из пп. 53-56 или пп. 58-74, третий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь второй антигенсвязывающей области по любому из пп. 53-56 или пп. 58-74, и четвертый полинуклеотид, кодирующий VL второй антигенсвязывающей области по любому из пп. 53-56 или пп. 58-74, или

(j) первый вектор, содержащий первый полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь первой антигенсвязывающей области по любому из пп. 53-56 или пп. 58-74, второй вектор, содержащий второй полинуклеотид, кодирующий легкую цепь первой антигенсвязывающей области по любому из пп. 53-56 или пп. 58-74, третий вектор, содержащий третий полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь второй антигенсвязывающей области по любому из пп. 53-56 или пп. 58-74, и четвертый вектор, содержащий четвертый полинуклеотид, кодирующий легкую цепь второй антигенсвязывающей области по любому из пп. 53-56 или пп. 58-74.

120. Рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая:

(a) полинуклеотид по п. 116;

(b) вектор по п. 118;

(c) полинуклеотид, кодирующий VH и VL выделенного антитела по любому из пп. 87-114;

(d) первый вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий VH и VL выделенного антитела по любому из пп. 87-114;

(e) первый полинуклеотид, кодирующий VH выделенного антитела по любому из пп. 87-114, и второй полинуклеотид, кодирующий VL выделенного антитела по любому

из пп. 87-114, или

(f) первый вектор, содержащий первый полинуклеотид, кодирующий VH выделенного антитела по любому из пп. 87-114, и второй вектор, содержащий второй полинуклеотид, кодирующий VL выделенного антитела по любому из пп. 87-114.

121. Фармацевтическая композиция, содержащая полиспецифическую молекулу по любому из пп. 1-86, п. 113 или п. 114, выделенное антитело по любому из пп. 87-114, полинуклеотид по п. 115 или п. 116, вектор по п. 117 или п. 118 или клетку-хозяина по п. 119 или п. 120 и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество.

122. Способ получения полиспецифической молекулы или выделенного антитела, при этом способ включает культивирование клетки-хозяина по п. 119 или п. 120 в подходящих условиях, так что экспрессируется полинуклеотид и продуцируются полиспецифическая молекула или выделенное антитело.

123. Способ получения полиспецифической молекулы, при этом способ включает экспрессию в клетке:

(a) первого полинуклеотида, кодирующего VH и VL первой антигенсвязывающей области по любому из пп. 1-86, п. 113 или п. 114, и второго полинуклеотида, кодирующего VH и VL второй антигенсвязывающей области по любому из пп. 1-86, п. 113 или п. 114, или

(b) первого полинуклеотида, кодирующего тяжелую цепь и легкую цепь первой антигенсвязывающей области по любому из пп. 1-86, п. 113 или п. 114, и второго полинуклеотида, кодирующего тяжелую цепь и легкую цепь второй антигенсвязывающей области по любому из пп. 1-86, п. 113 или п. 114,

в подходящих условиях, так что экспрессируются полинуклеотиды и продуцируется полиспецифическая молекула.

124. Способ получения полиспецифической молекулы, при этом способ включает экспрессию в клетке:

(a) первого полинуклеотида, кодирующего VH первой антигенсвязывающей области по любому из пп. 1-86, п. 113 или п. 114, второго полинуклеотида, кодирующего VL первой антигенсвязывающей области по любому из пп. 1-86, п. 113 или п. 114, третьего полинуклеотида, кодирующего VH второй антигенсвязывающей области по любому из пп. 1-86, п. 113 или п. 114, и четвертого полинуклеотида, кодирующего VL второй антигенсвязывающей области по любому из пп. 1-86, п. 113 или п. 114, или

(b) первого полинуклеотида, кодирующего тяжелую цепь первой антигенсвязывающей области по любому из пп. 1-86, п. 113 или п. 114, второго полинуклеотида, кодирующего легкую цепь первой антигенсвязывающей области по любому из пп. 1-86, п. 113 или п. 114, третьего полинуклеотида, кодирующего тяжелую цепь второй антигенсвязывающей области по любому из пп. 1-86, п. 113 или п. 114, и четвертого полинуклеотида, кодирующего легкую цепь второй антигенсвязывающей области по любому из пп. 1-86, п. 113 или п. 114,

в подходящих условиях, так что экспрессируются полинуклеотиды и продуцируется полиспецифическая молекула.

125. Способ получения полиспецифической молекулы, при этом способ включает:

(а) экспрессию в первой клетке первого полинуклеотида, кодирующего VH и VL первой антигенсвязывающей области по любому из пп. 1-86, п. 113 или п. 114, в условиях, при которых продуцируется первая антигенсвязывающая область;

(b) экспрессию во второй клетке второго полинуклеотида, кодирующего VH и VL второй антигенсвязывающей области по любому из пп. 1-86, п. 113 или п. 114, в условиях, при которых продуцируется вторая антигенсвязывающая область, и

(с) приведение в контакт первой и второй антигенсвязывающих областей, продуцированных на стадиях (а) и (b), в подходящих условиях, обеспечивающих продуцирование полиспецифической молекулы.

126. Способ получения полиспецифической молекулы, при этом способ включает:

(а) экспрессию в первой клетке первого полинуклеотида, кодирующего VH первой антигенсвязывающей области по любому из пп. 1-86, п. 113 или п. 114, и второго полинуклеотида, кодирующего VL первой антигенсвязывающей области по любому из пп. 1-86, п. 113 или п. 114, в условиях, при которых продуцируется первая антигенсвязывающая область;

(b) экспрессию во второй клетке третьего полинуклеотида, кодирующего VH второй антигенсвязывающей области по любому из пп. 1-86, п. 113 или п. 114, и четвертого полинуклеотида, кодирующего VL второй антигенсвязывающей области по любому из пп. 1-86, п. 113 или п. 114, в условиях, при которых продуцируется вторая антигенсвязывающая область, и

(с) приведение в контакт первой и второй антигенсвязывающих областей, продуцированных на стадиях (а) и (b), в условиях, обеспечивающих продуцирование полиспецифической молекулы.

127. Способ получения полиспецифической молекулы, при этом способ включает приведение в контакт первой антигенсвязывающей области и второй антигенсвязывающей области по любому из пп. 1-86, п. 113 или п. 114 в условиях, обеспечивающих продуцирование полиспецифической молекулы.

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

(а) полинуклеотида, кодирующего VH и VL антитела по любому из пп. 87-114, или

(b) полинуклеотида, кодирующего тяжелую цепь и легкую цепь антитела по любому из пп. 87-114,

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

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

(а) первого полинуклеотида, кодирующего VH антитела по любому из пп. 87-114, и второго полинуклеотида, кодирующего VL антитела по любому из пп. 87-114, или

(b) первого полинуклеотида, кодирующего тяжелую цепь антитела по любому из пп. 87-114, и второго полинуклеотида, кодирующего легкую цепь легкой цепи антитела по любому из пп. 87-114,

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

130. Способ усиления иммунного ответа у субъекта, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества полиспецифической молекулы по любому из пп. 1-86, п. 113 или п. 114, выделенного антитела по любому из пп. 87-114, полинуклеотида по п. 115 или п. 116, вектора по п. 117 или п. 118, клетки-хозяина по п. 119 или п. 120 или фармацевтической композиции по п. 121.

131. Способ лечения рака у субъекта, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества полиспецифической молекулы по любому из пп. 1-86, п. 113 или п. 114, выделенного антитела по любому из пп. 87-114, полинуклеотида по п. 115 или п. 116, вектора по п. 117 или п. 118, клетки-хозяина по п. 119 или п. 120 или фармацевтической композиции по п. 121.

132. Способ по п. 130 или п. 131, где полиспецифическая молекула, выделенное антитело, полинуклеотид, вектор, клетку-хозяина или фармацевтическую композицию вводят системно, внутривенно, подкожно, внутрь опухоли или доставляют в дренирующий опухоль лимфатический узел.

133. Способ по любому из пп. 130-132, дополнительно включающий введение субъекту дополнительного терапевтического средства.

134. Способ по п. 133, где дополнительным терапевтическим средством является химиотерапевтическое средство.

135. Способ по п. 134, где дополнительным терапевтическим средством является средство, нацеливающееся на контрольную точку иммунного ответа.

136. Способ по п. 135, 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.

137. Способ по п. 136, где дополнительным терапевтическим средством является антитело к PD-1, где необязательно антитело к PD-1 является пембролизумабом или ниволумабом.

138. Способ по п. 133, где дополнительным терапевтическим средством является ингибитор индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO).

139. Способ по п. 138, где ингибитор выбран из группы, состоящей из эпакадостата, F001287, индоксимода и NLG919.

140. Способ по п. 133, где дополнительным терапевтическим средством является вакцина.

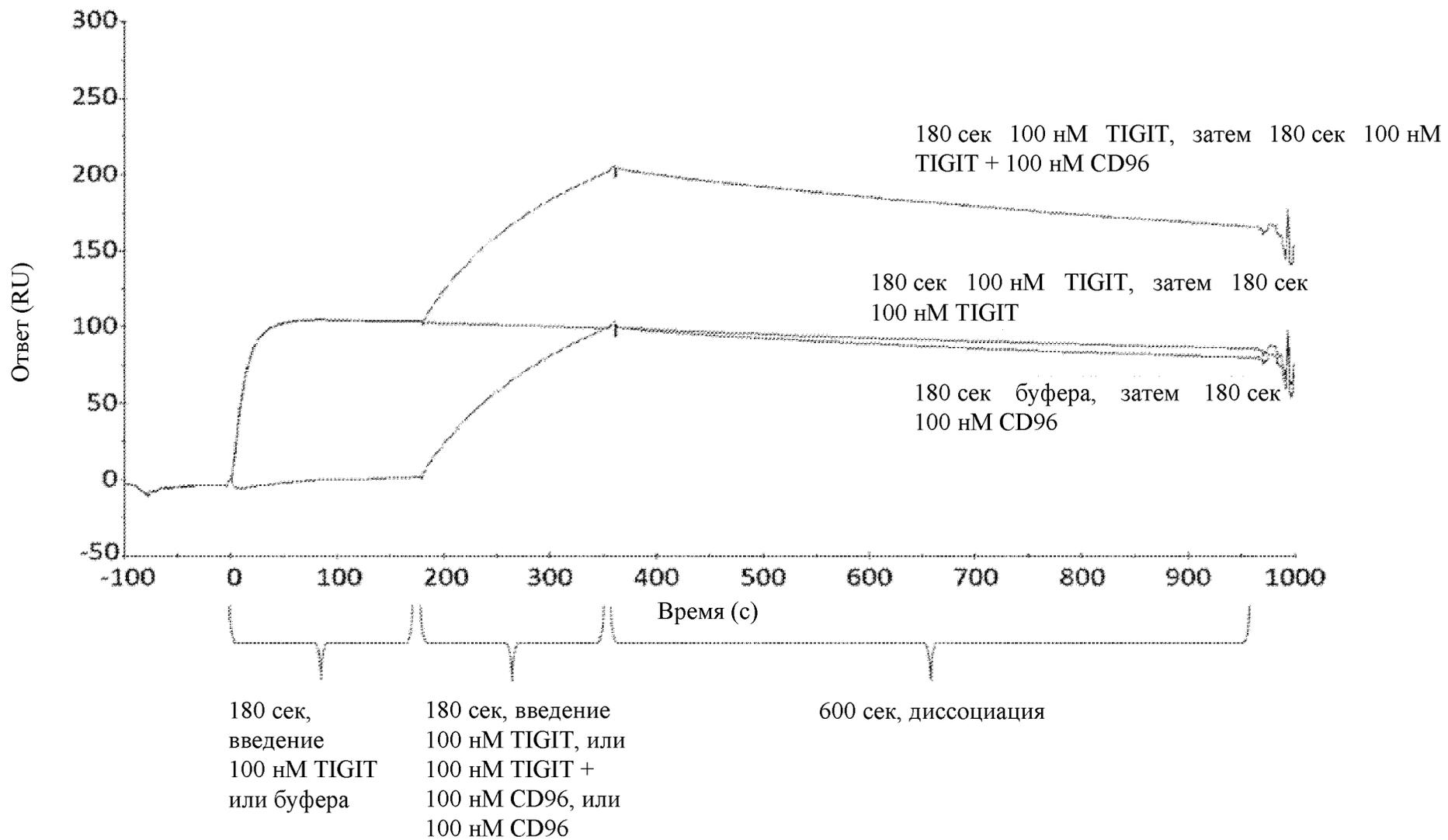
141. Способ по п. 140, где вакцина содержит комплекс белок теплового шока-пептид (HSPPC), содержащий белок теплового шока в комплексе с антигенным пептидом.

142. Способ по п. 141, где белок теплового шока представляет собой hsc70 и образует комплекс с опухолеассоциированным антигенным пептидом.

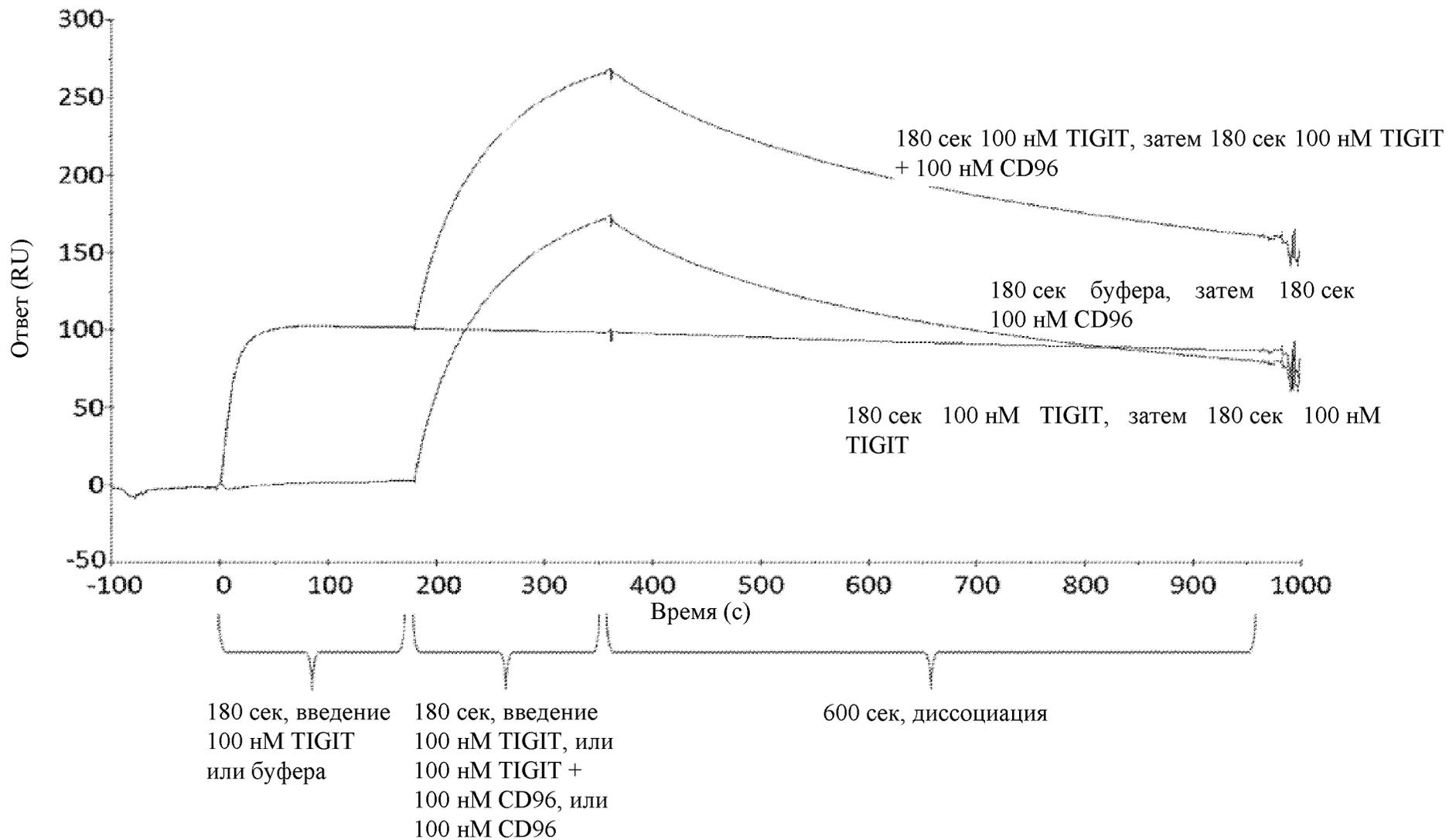
143. Способ по п. 141, где белок теплового шока представляет собой белок gp96 и образует комплекс с опухолеассоциированным антигенным пептидом, где необязательно HSPPC происходит из опухоли, полученной от субъекта.

144. Способ лечения инфекционного заболевания у субъекта, при этом способ включает введение субъекту эффективного количества полиспецифической молекулы по любому из пп. 1-86, п. 113 или п. 114, выделенного антитела по любому из пп. 87-114, полинуклеотида по п. 115 или п. 116, вектора по п. 117 или п. 118, клетки-хозяина по п. 119 или п. 120 или фармацевтической композиции по п. 121.

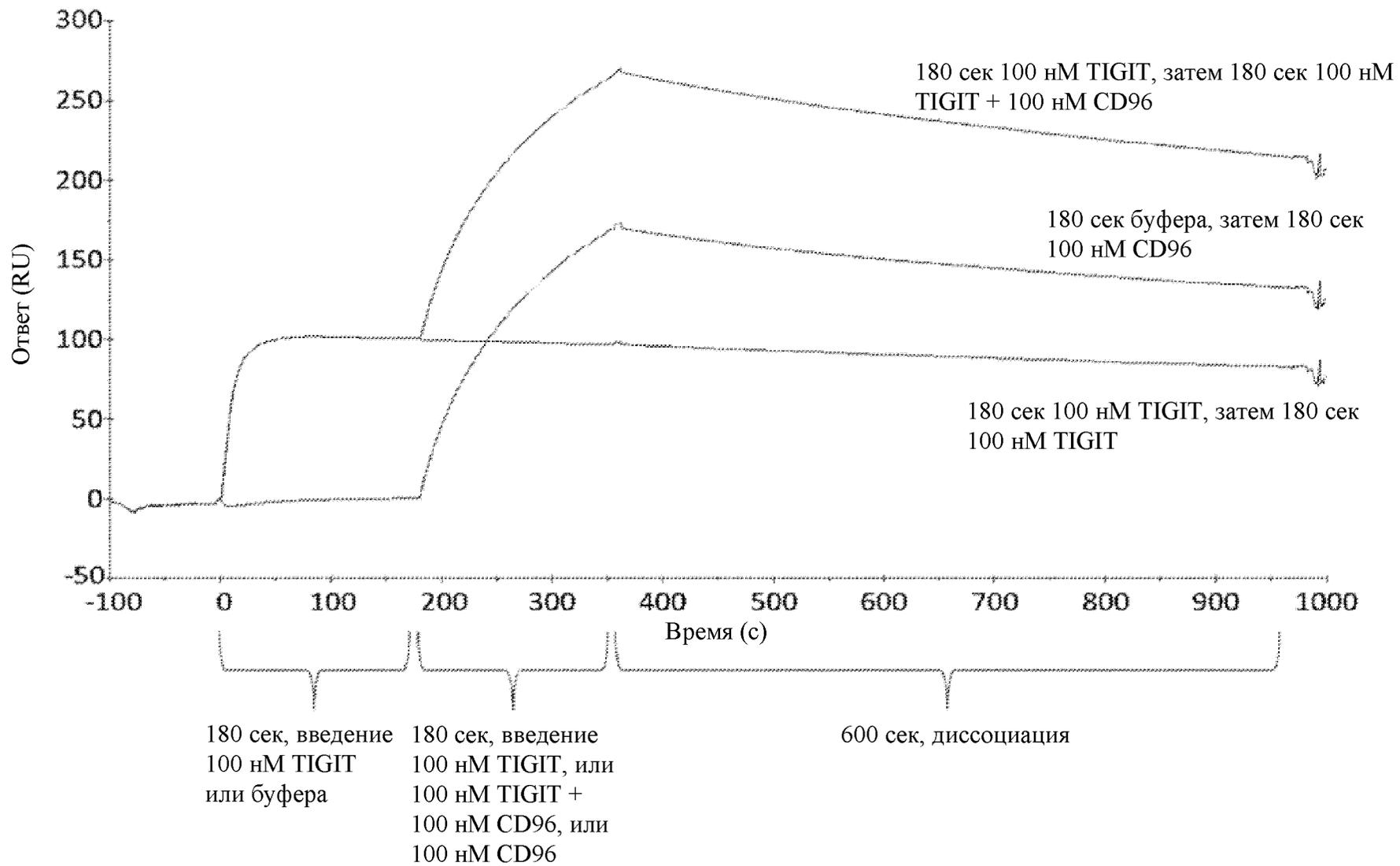
По доверенности



Фиг. 1А

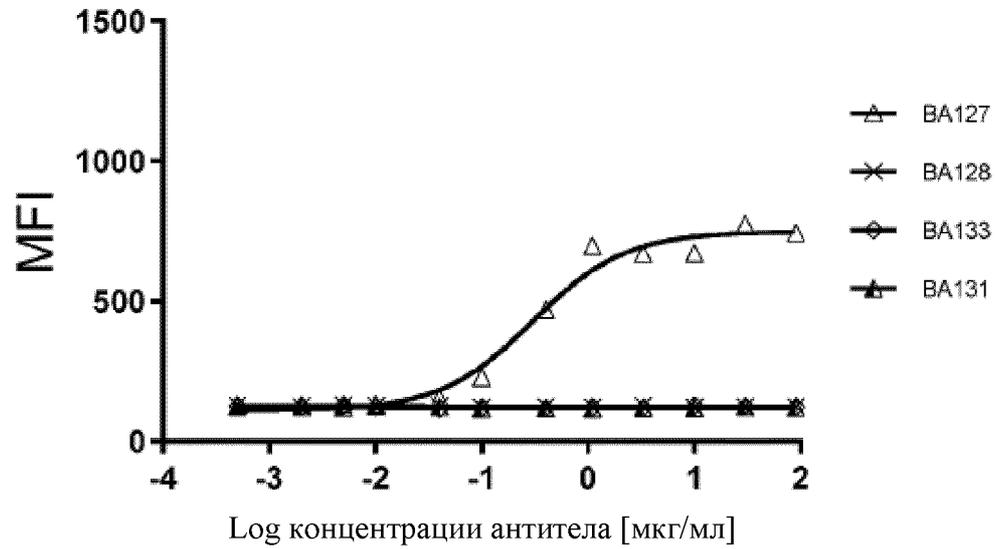


Фиг. 1В



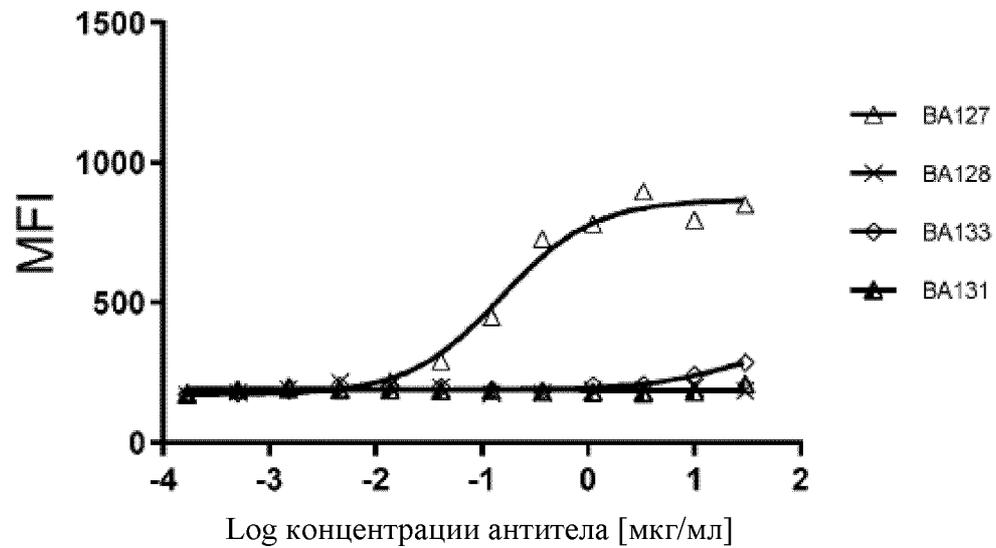
Фиг. 1С

CHO hu-TIGIT с huCD96-His

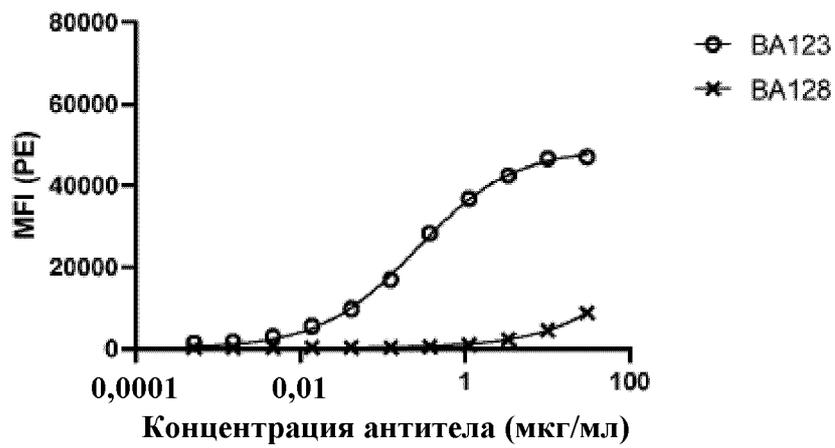


Фиг. 2А

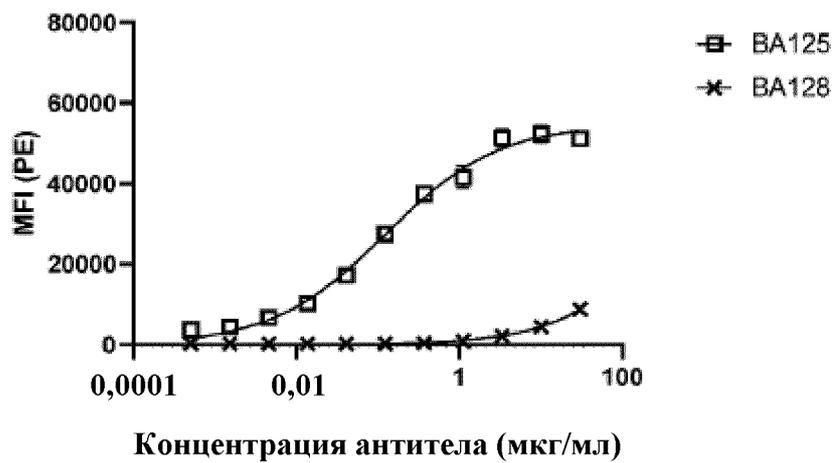
CHO hu-CD96 с huTIGIT-His



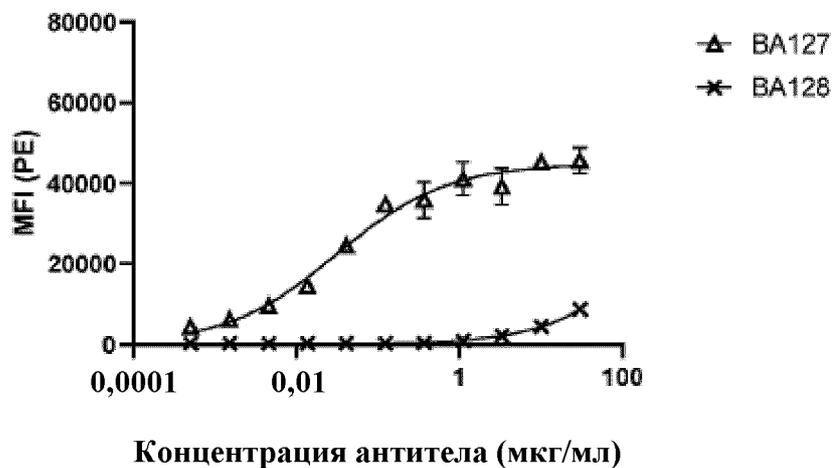
Фиг. 2В



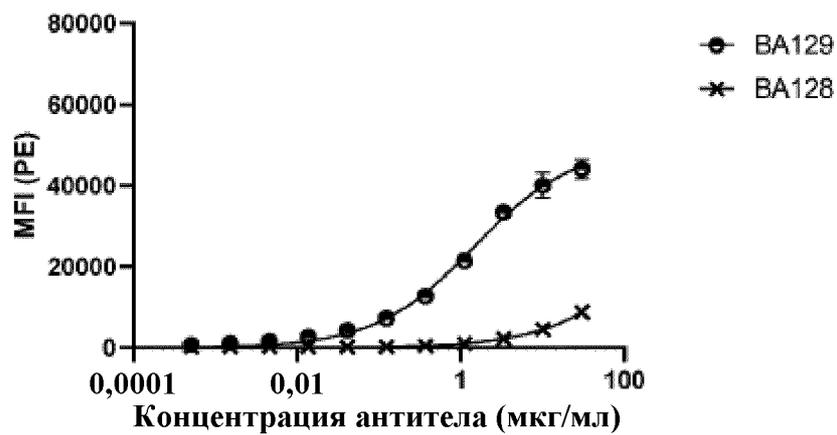
Фиг. 3А



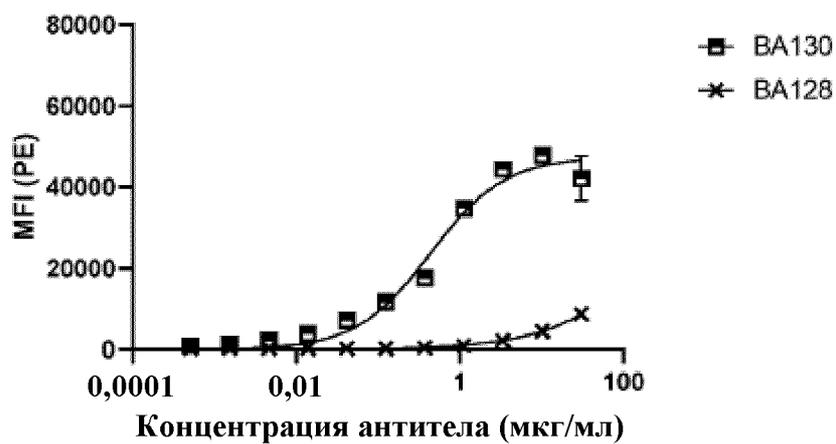
Фиг. 3В



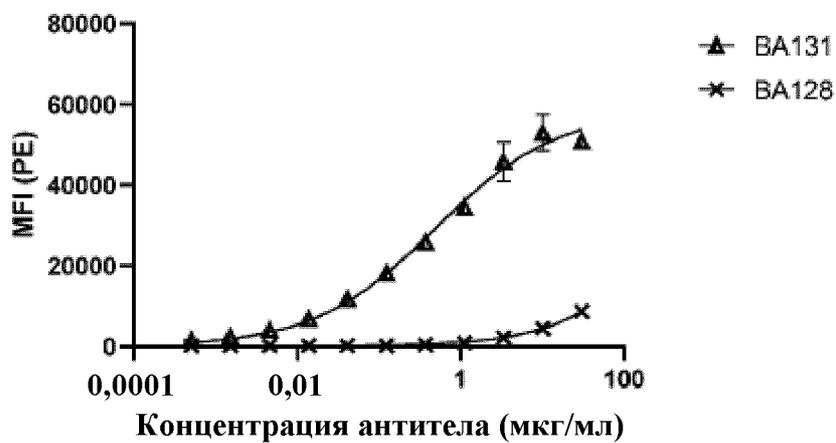
Фиг. 3С



Фиг. 3D

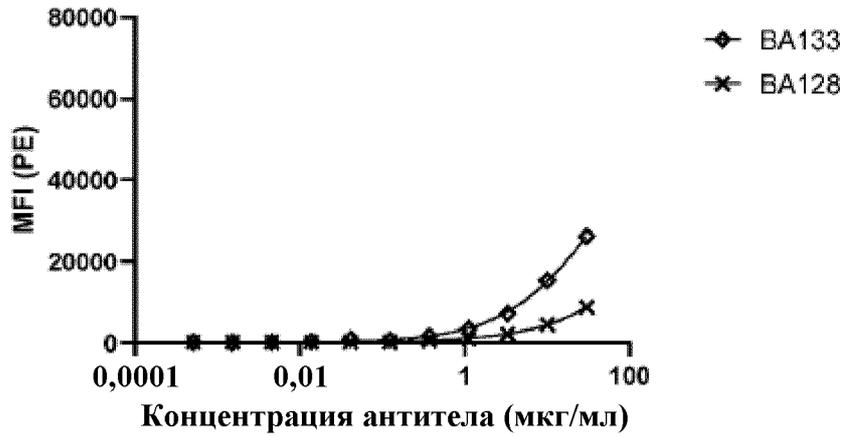


Фиг. 3E

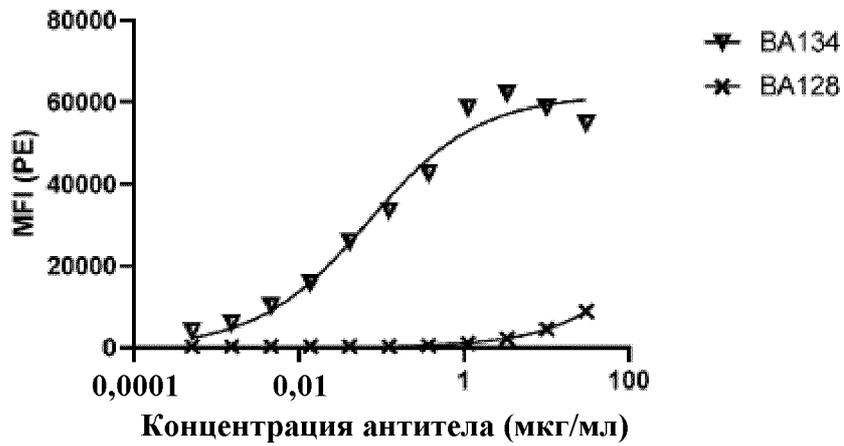


Фиг. 3F

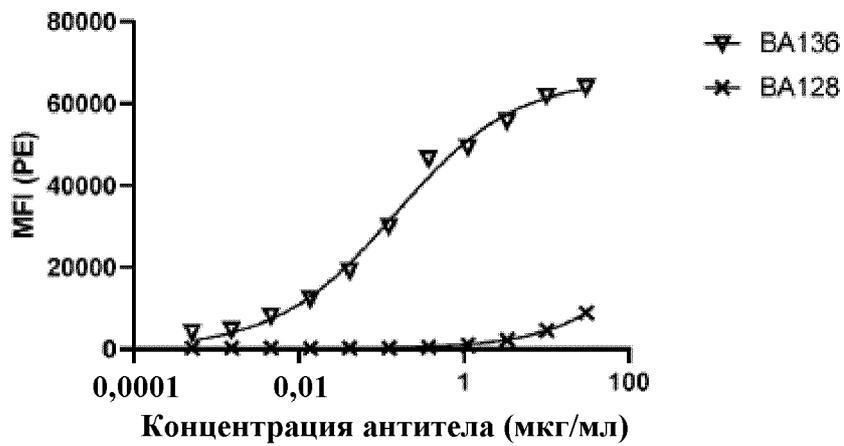
7/68



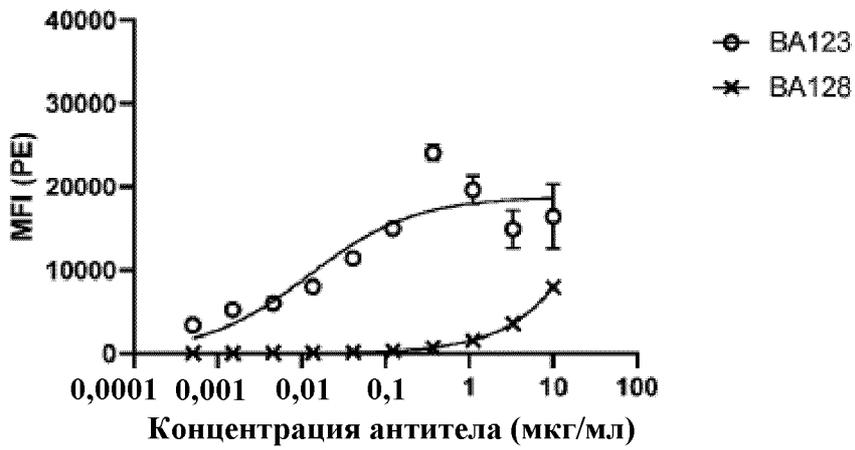
Фиг. 3G



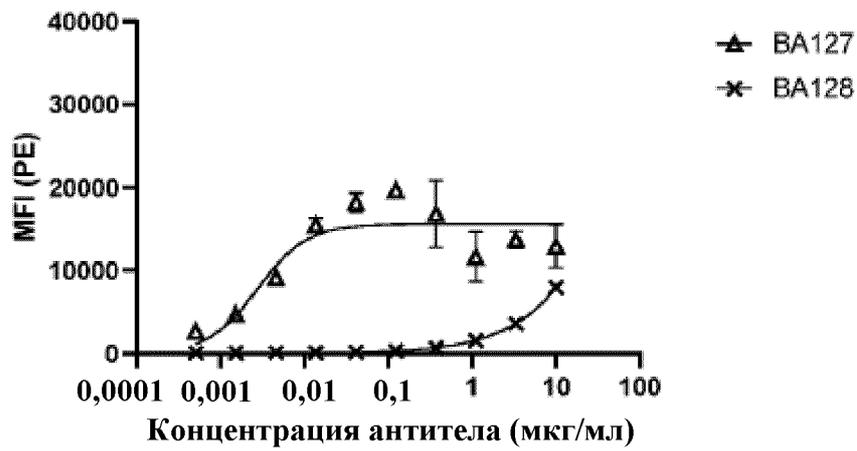
Фиг. 3H



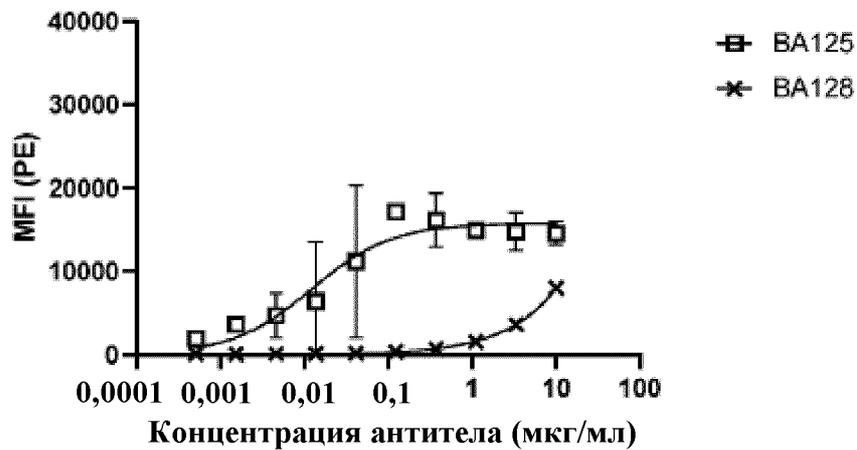
Фиг. 3I



Фиг. 4А

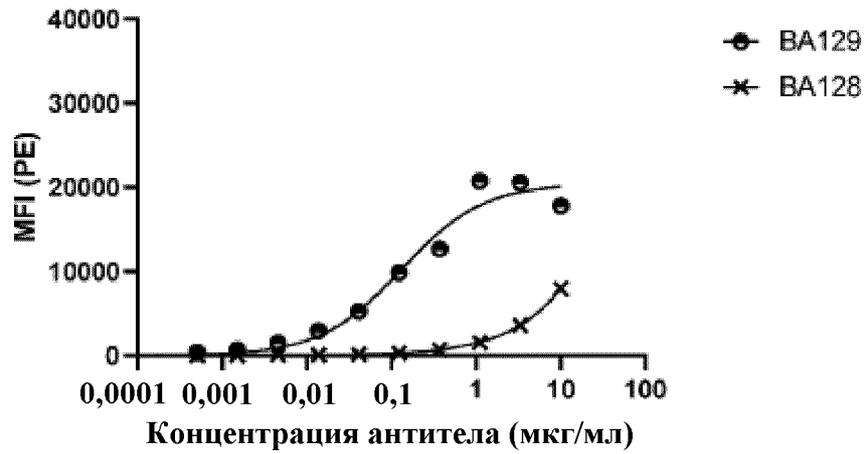


Фиг. 4В

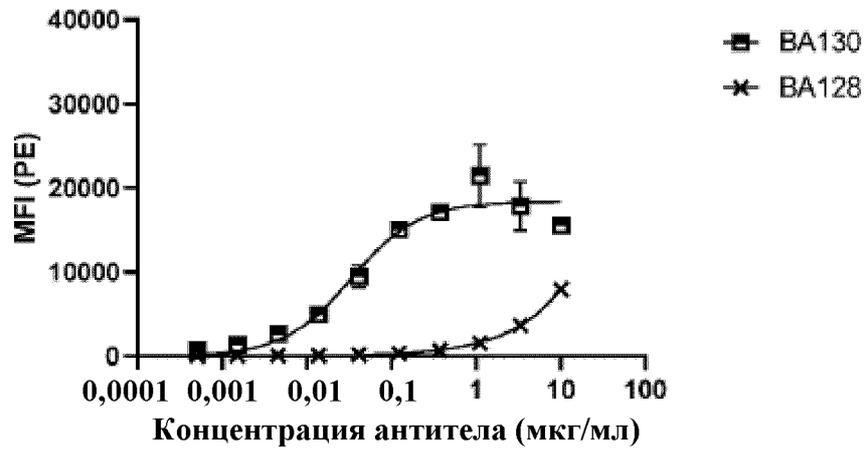


Фиг. 4С

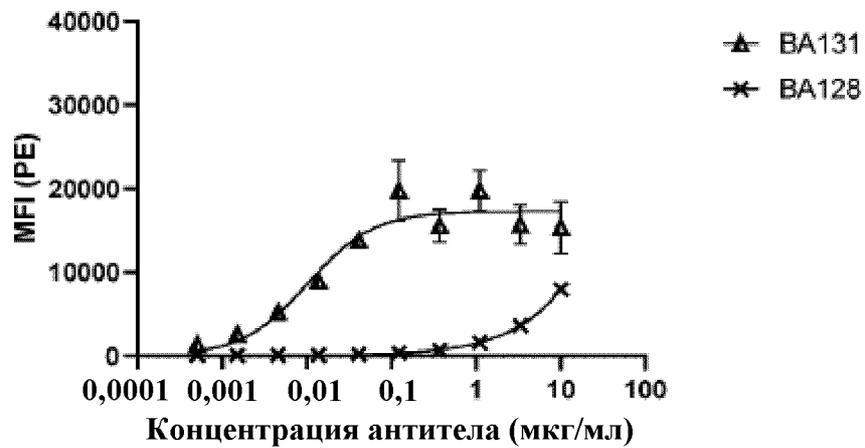
9/68



Фиг. 4D

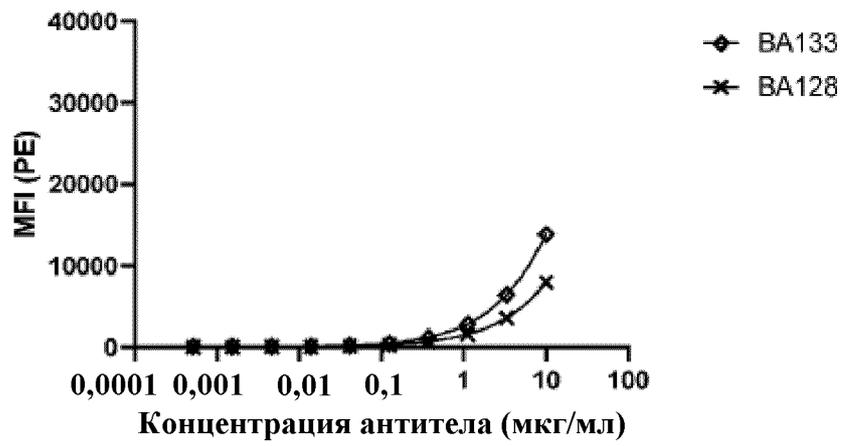


Фиг. 4E

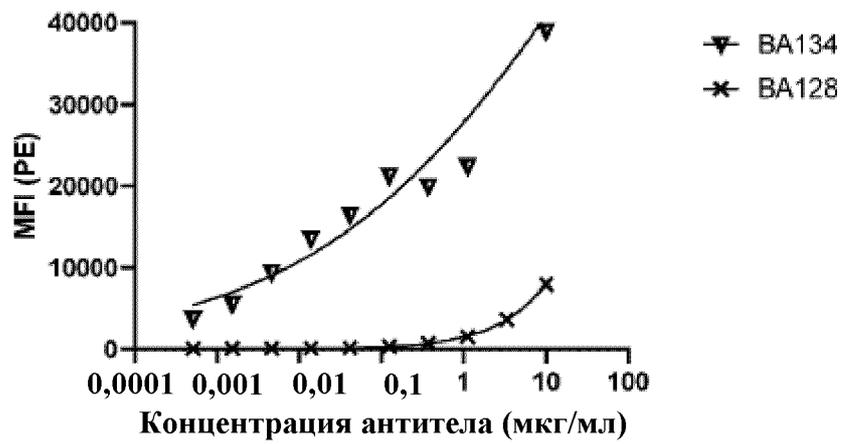


Фиг. 4F

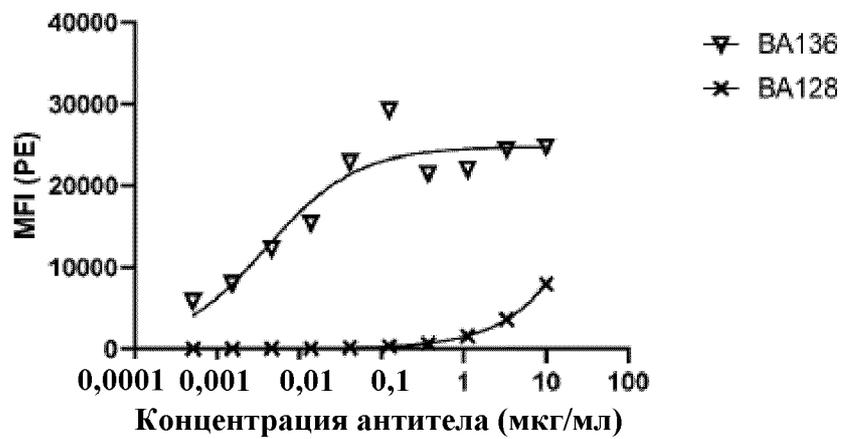
10/68



Фиг. 4G

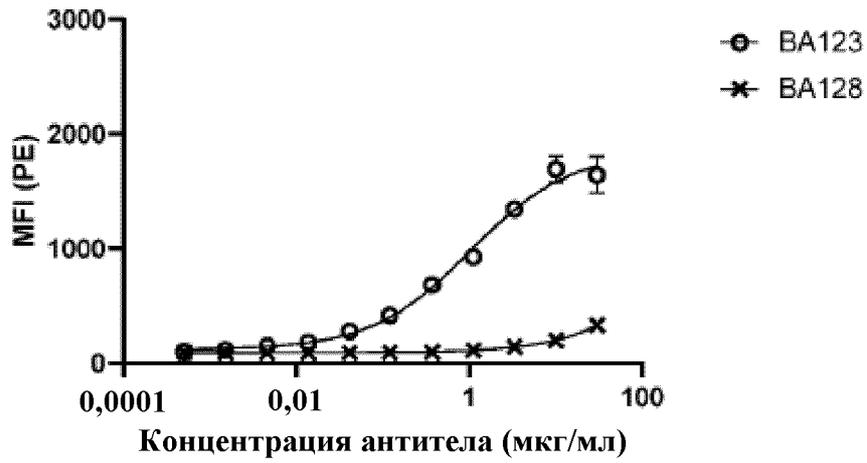


Фиг. 4H

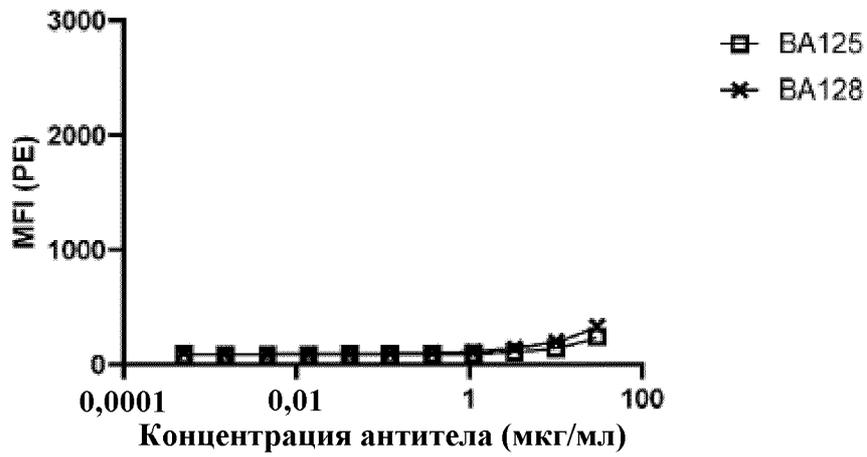


Фиг. 4I

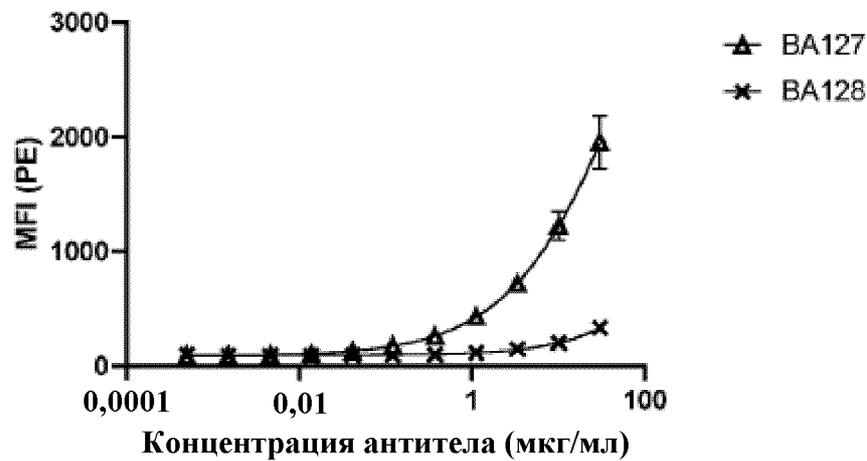
11/68



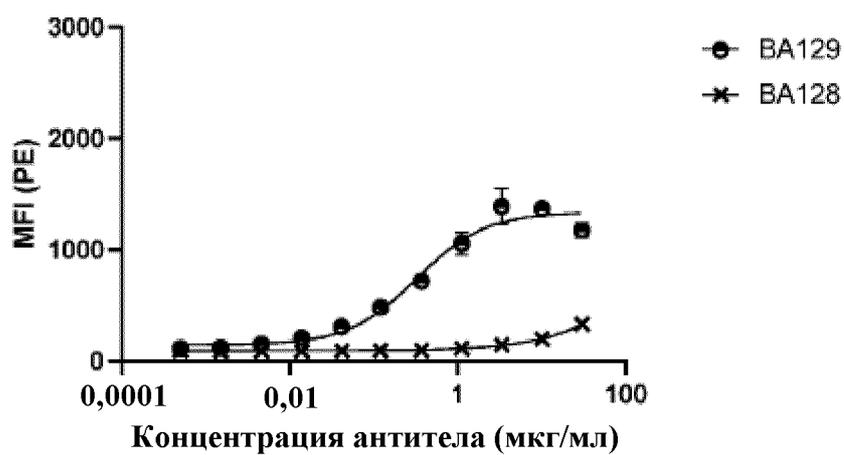
Фиг. 5А



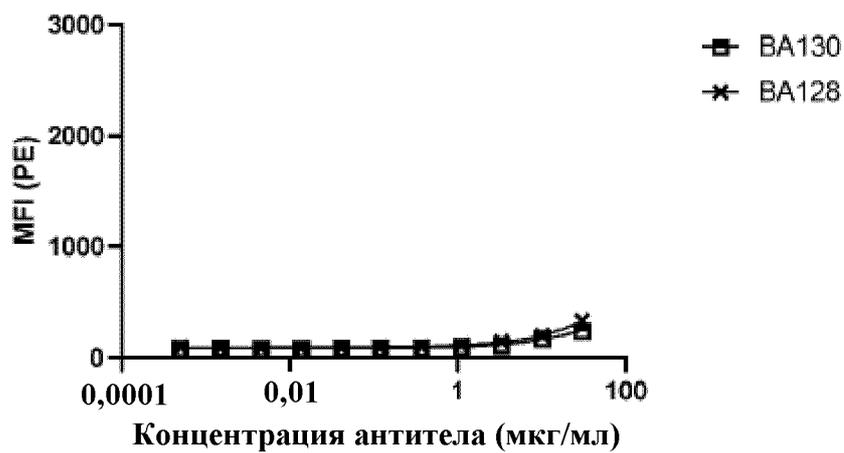
Фиг. 5В



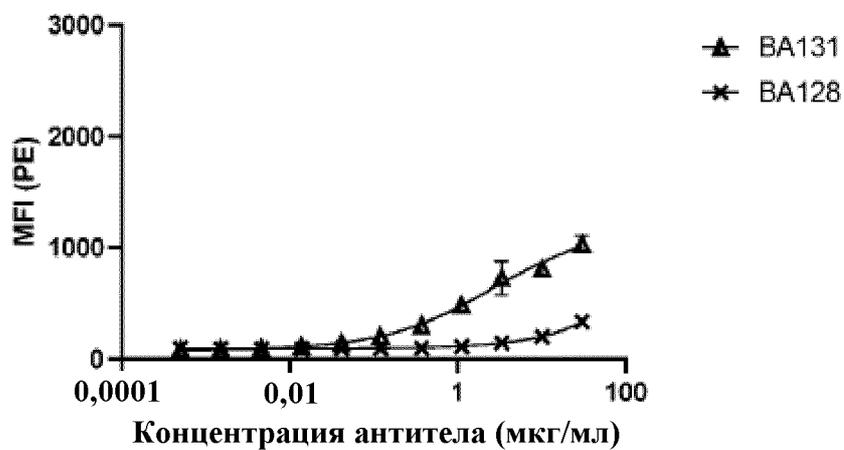
Фиг. 5С



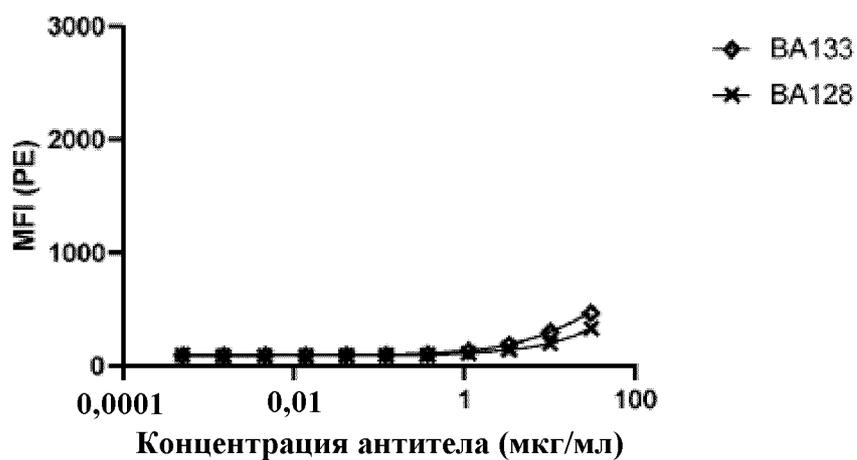
Фиг. 5D



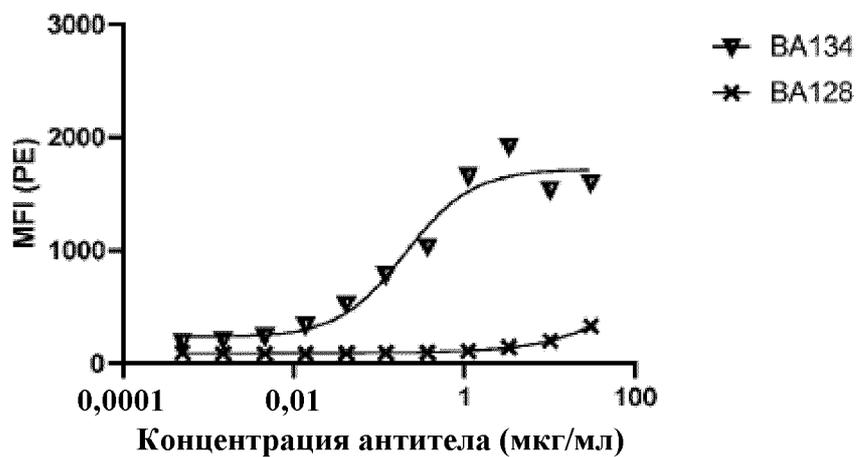
Фиг. 5E



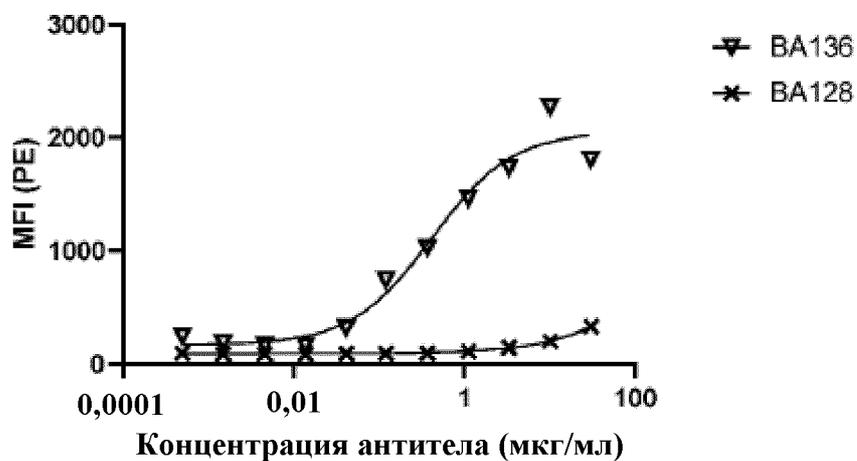
Фиг. 5F



Фиг. 5G

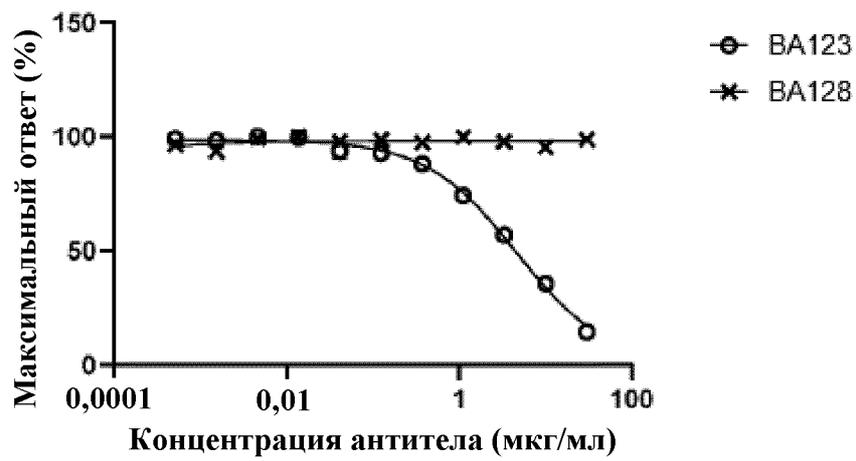


Фиг. 5H

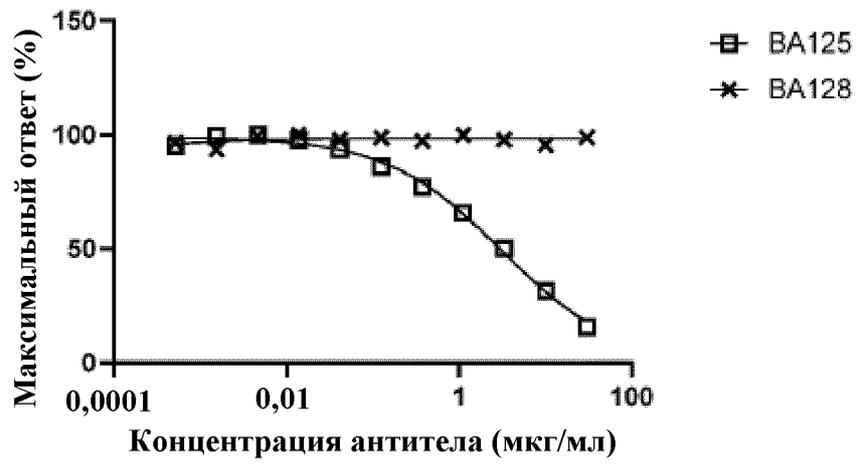


Фиг. 5I

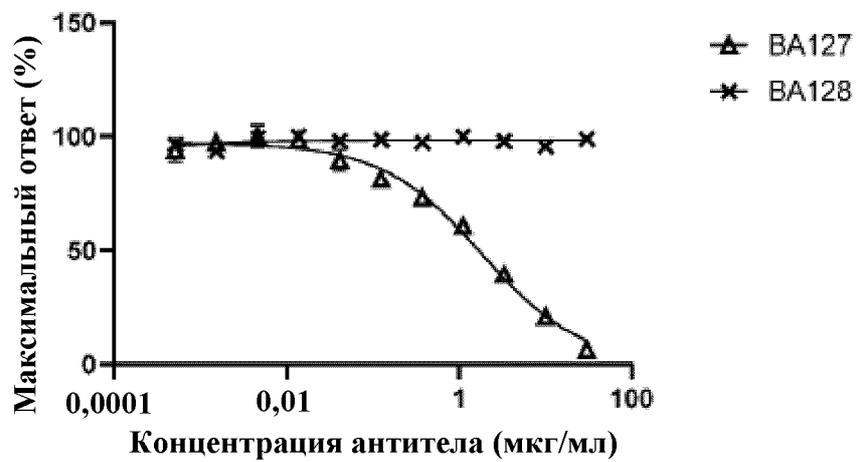
14/68



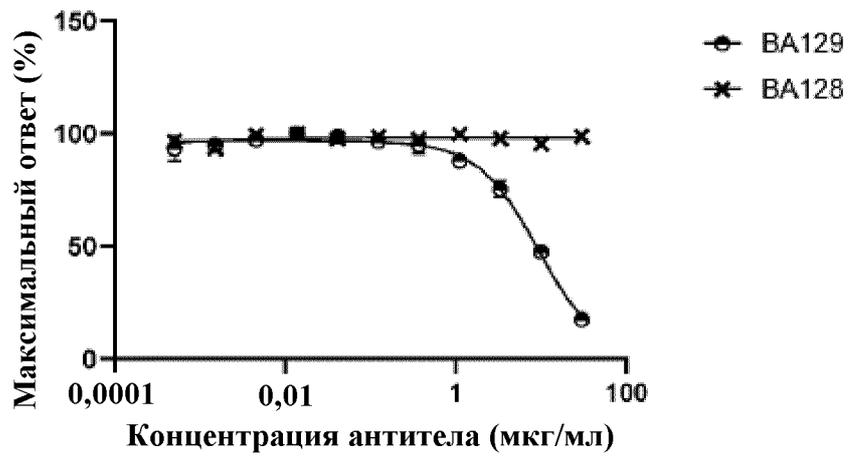
Фиг. 6А



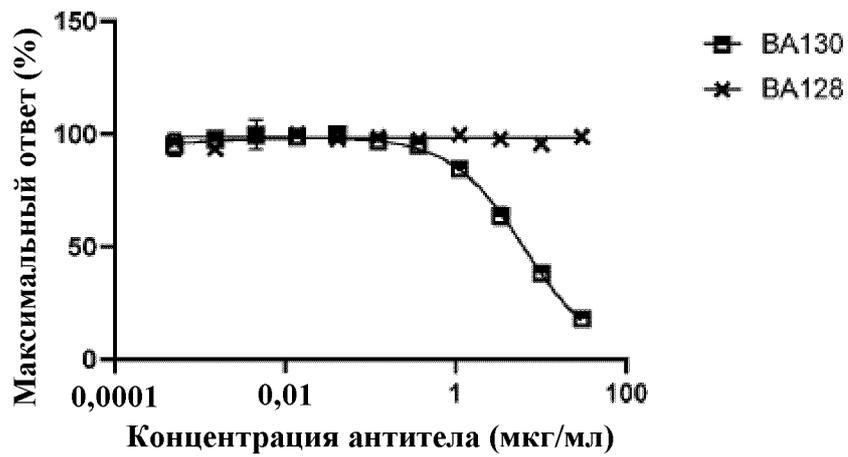
Фиг. 6В



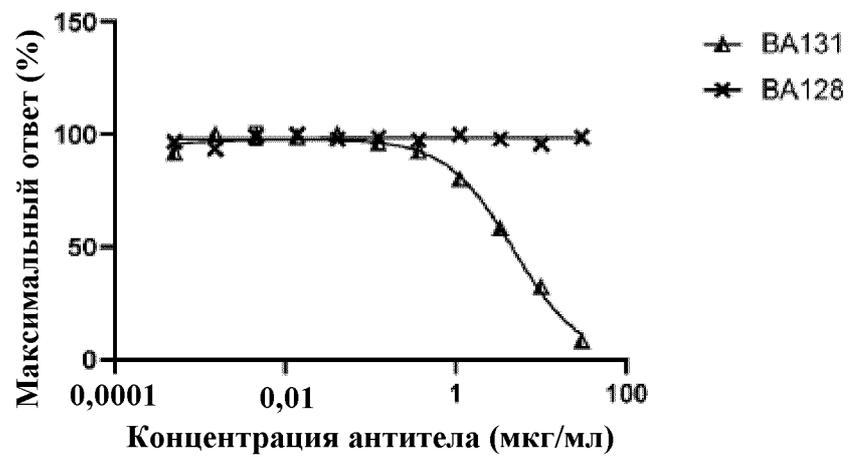
Фиг. 6С



Фиг. 6D

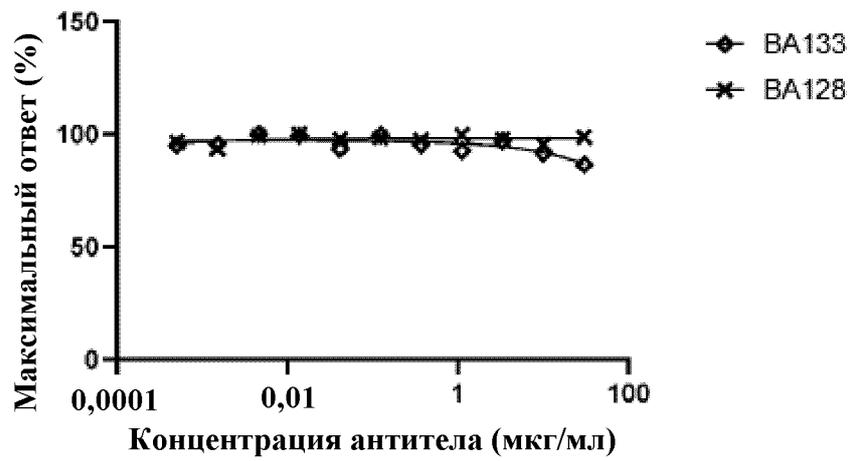


Фиг. 6E

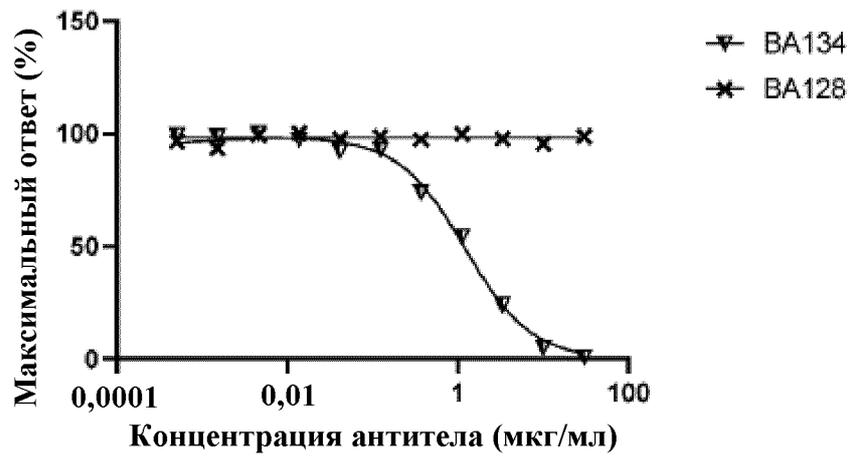


Фиг. 6F

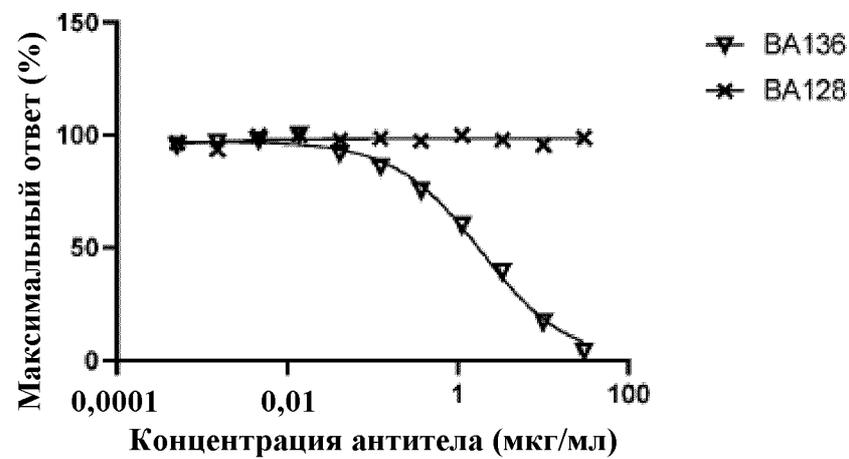
16/68



Фиг. 6G

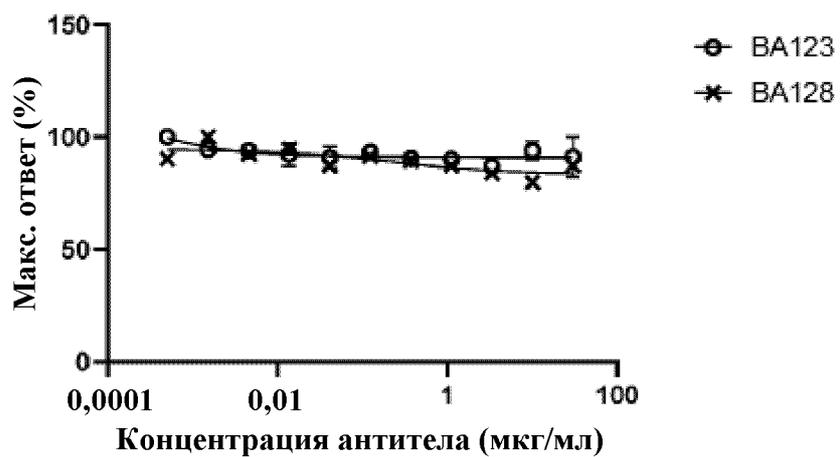


Фиг. 6H

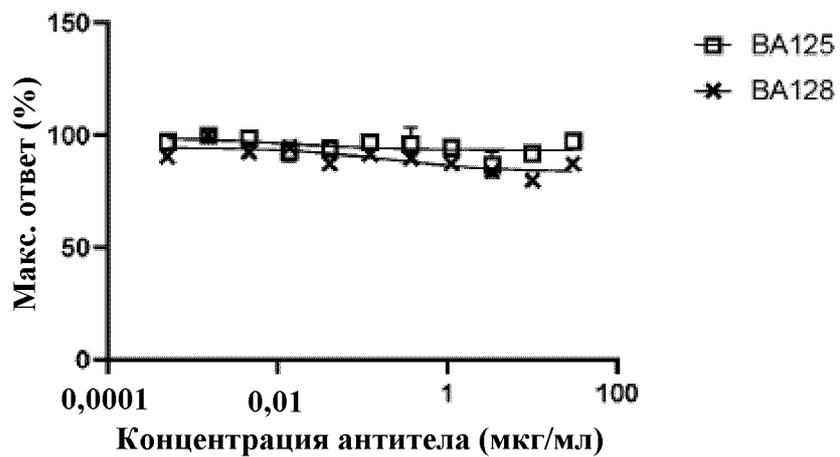


Фиг. 6I

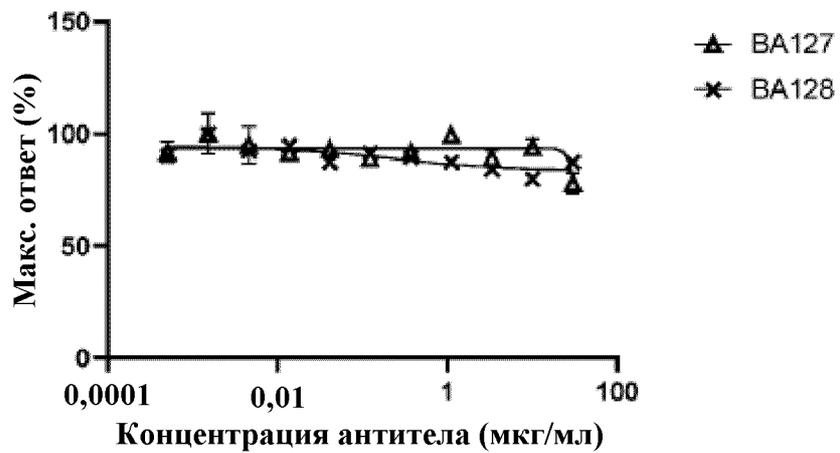
17/68



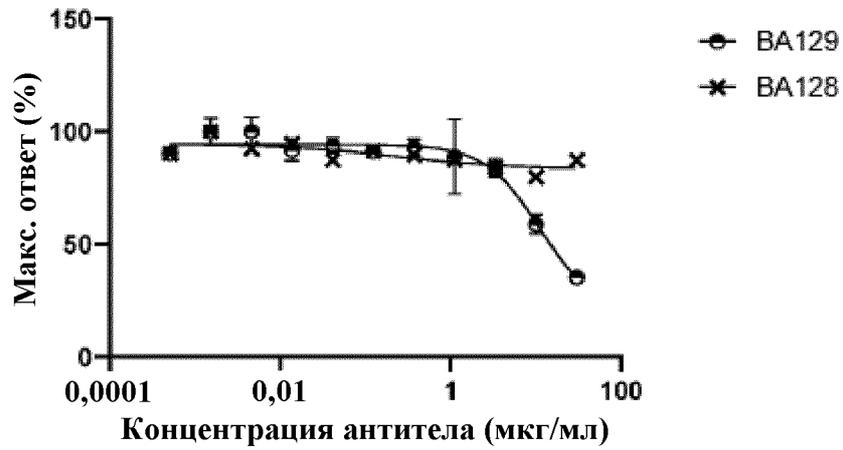
Фиг. 7А



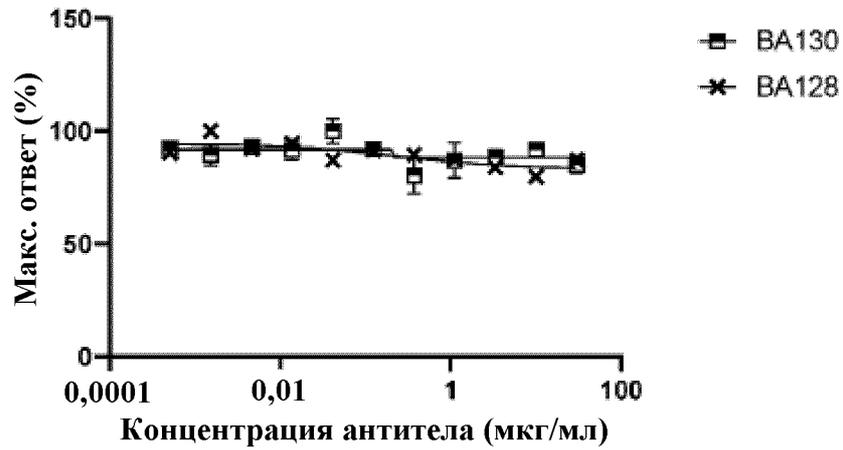
Фиг. 7В



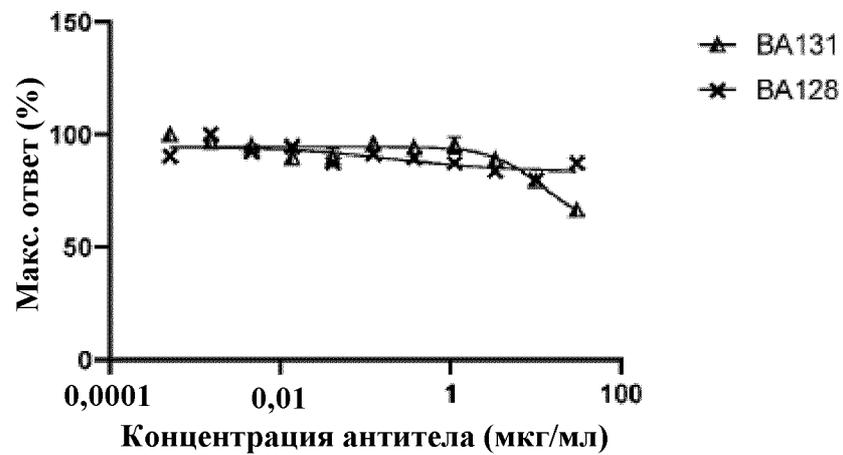
Фиг. 7С



Фиг. 7D

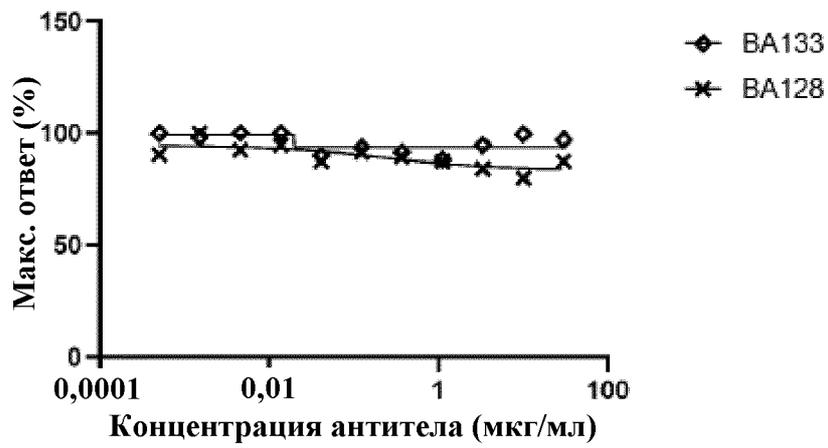


Фиг. 7E

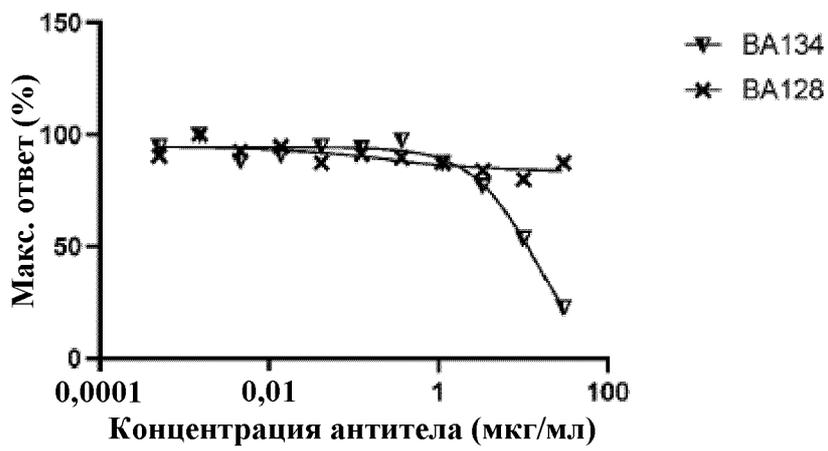


Фиг. 7F

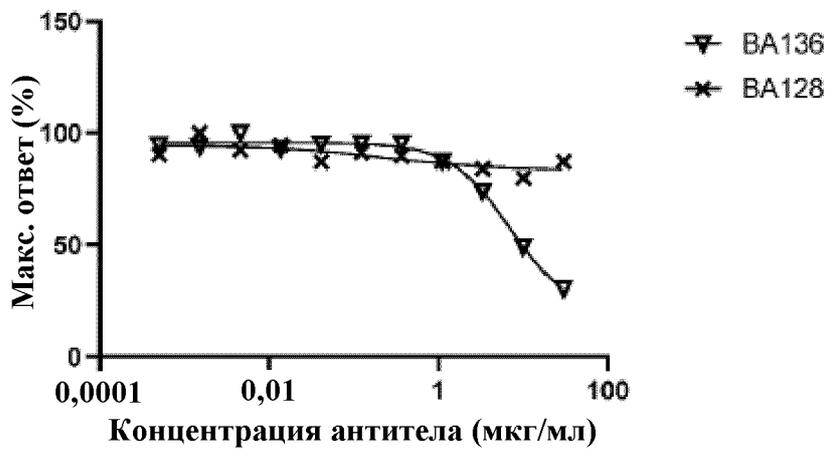
19/68



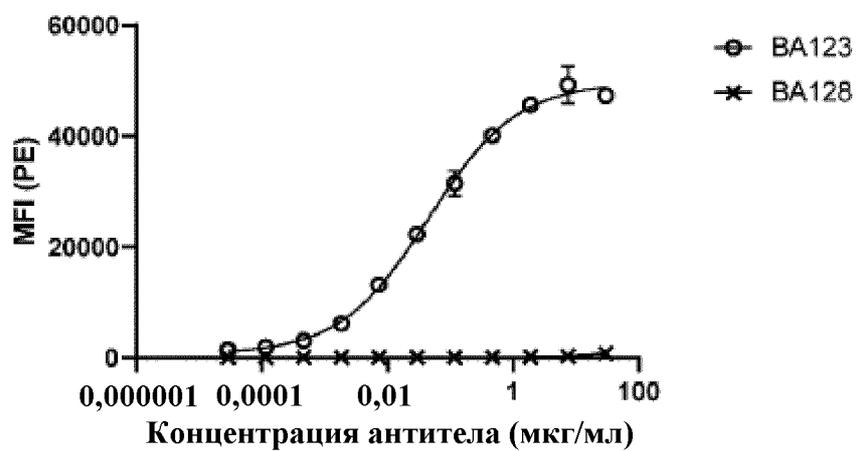
Фиг. 7G



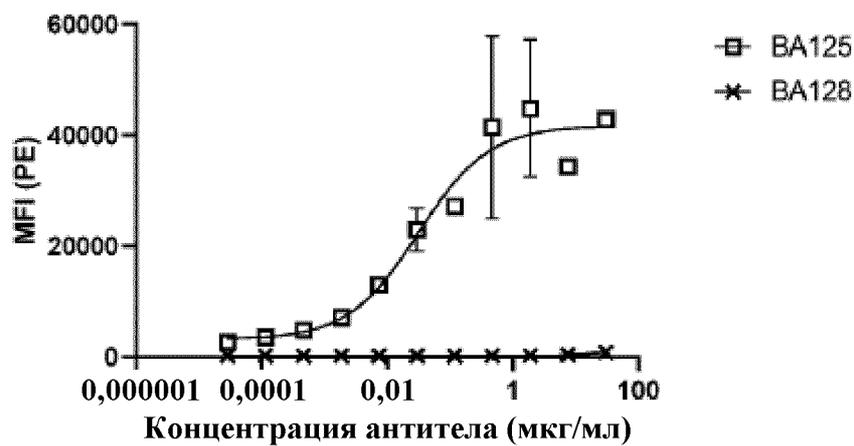
Фиг. 7H



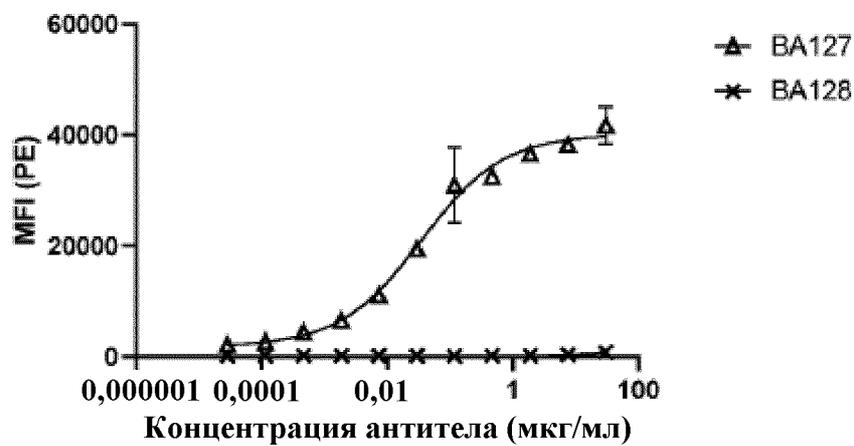
Фиг. 7I



Фиг. 8А

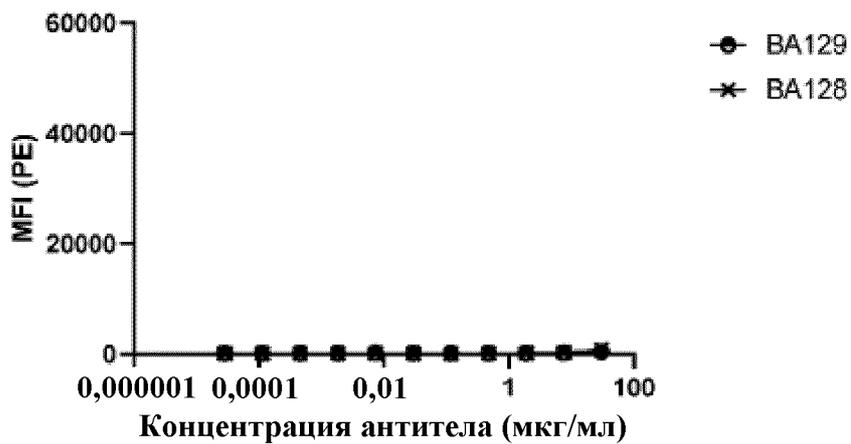


Фиг. 8В

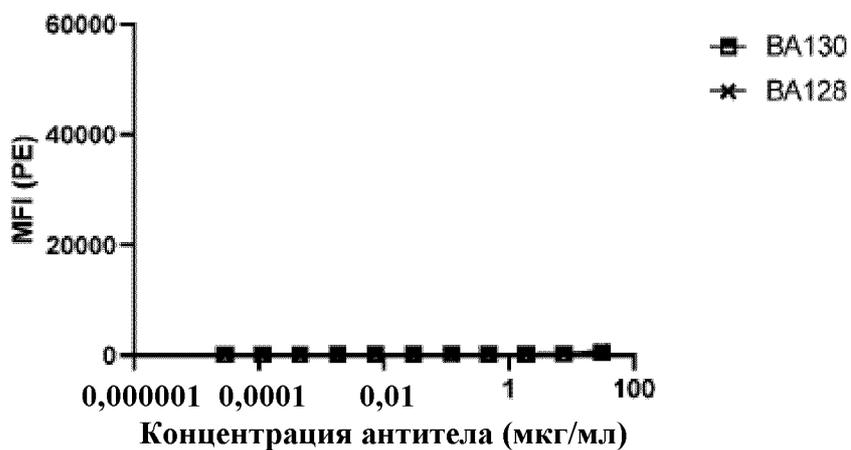


Фиг. 8С

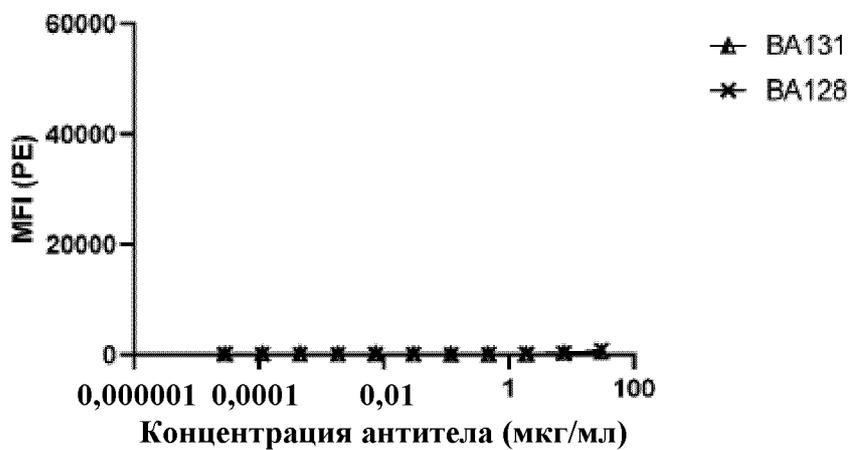
21/68



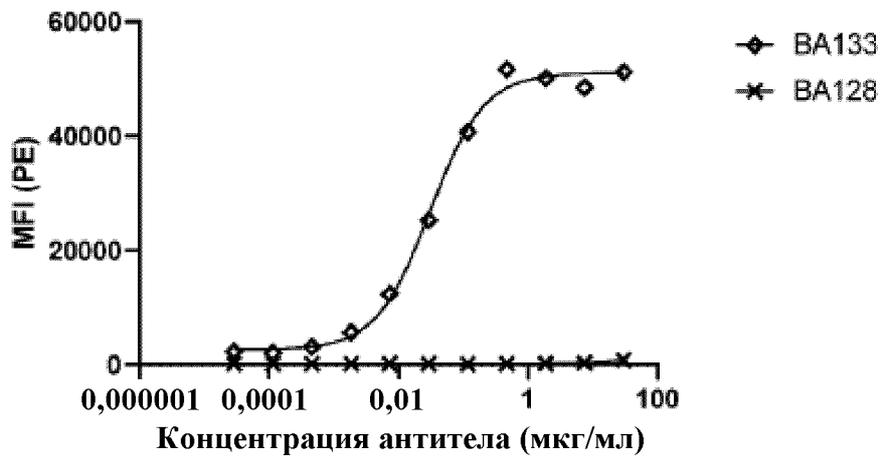
Фиг. 8D



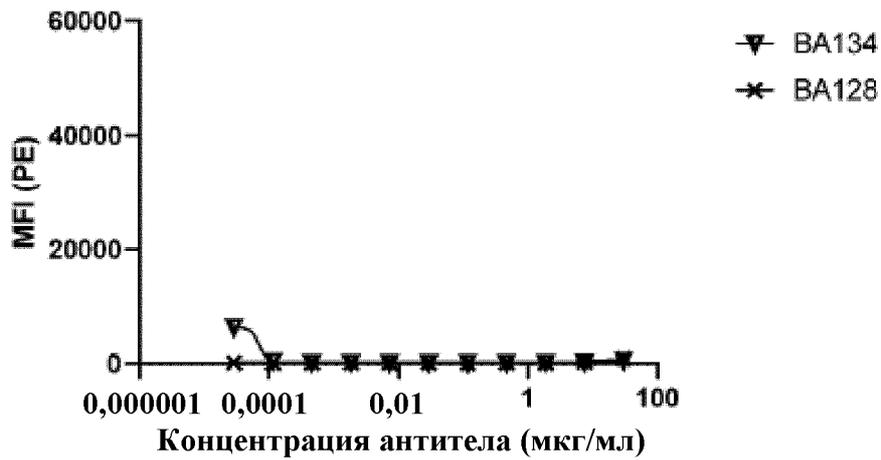
Фиг. 8E



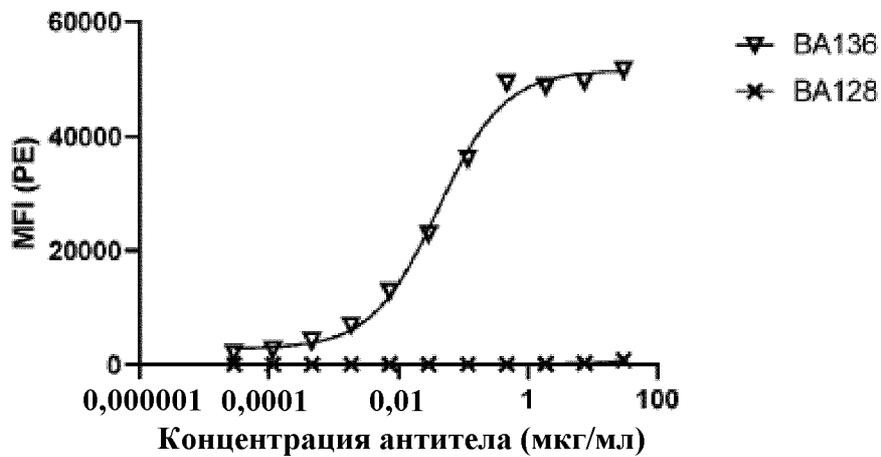
Фиг. 8F



Фиг. 8G

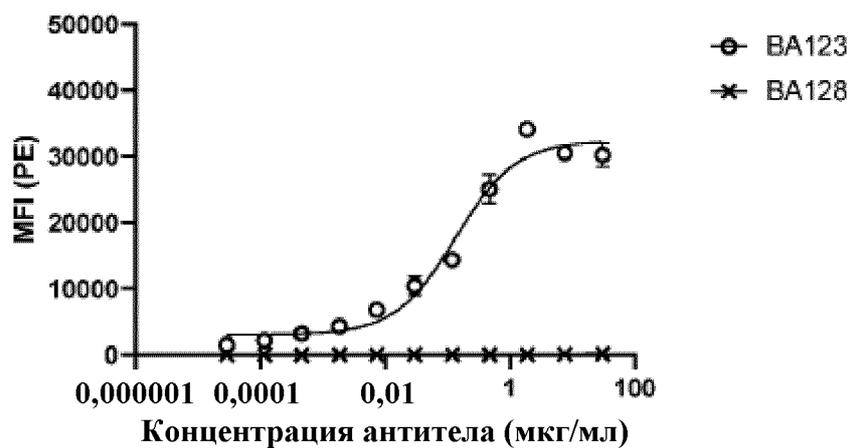


Фиг. 8H

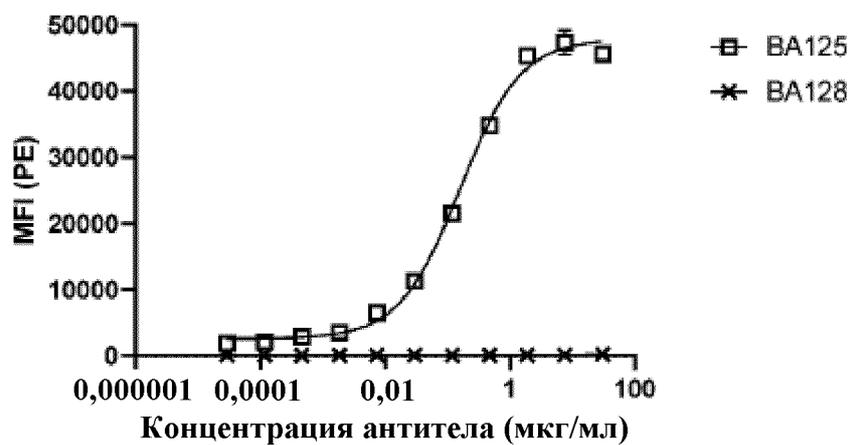


Фиг. 8I

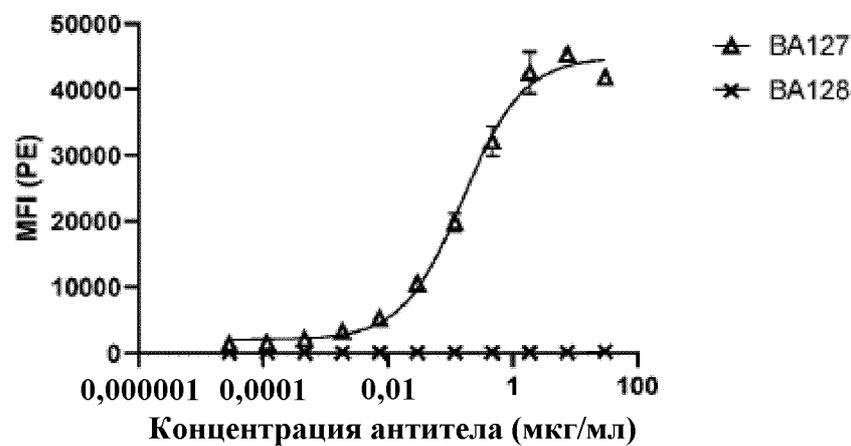
23/68



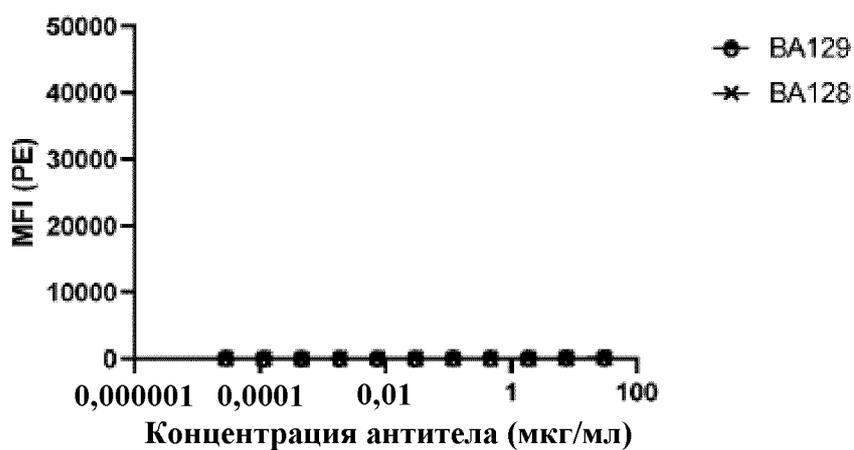
Фиг. 9А



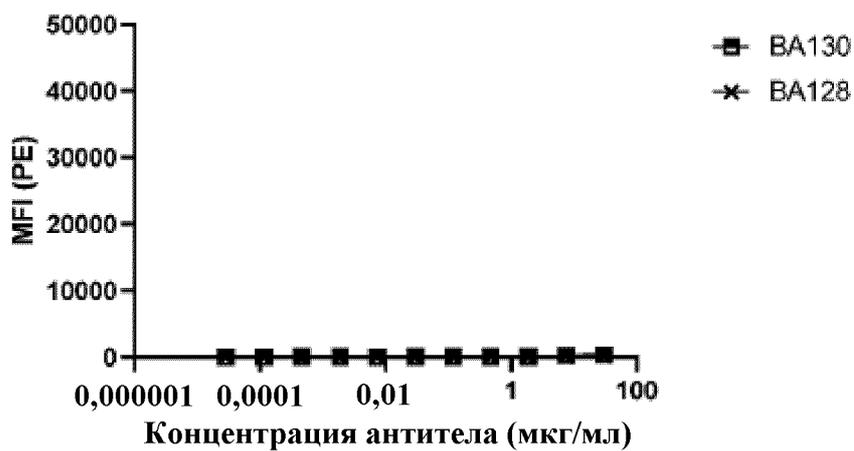
Фиг. 9В



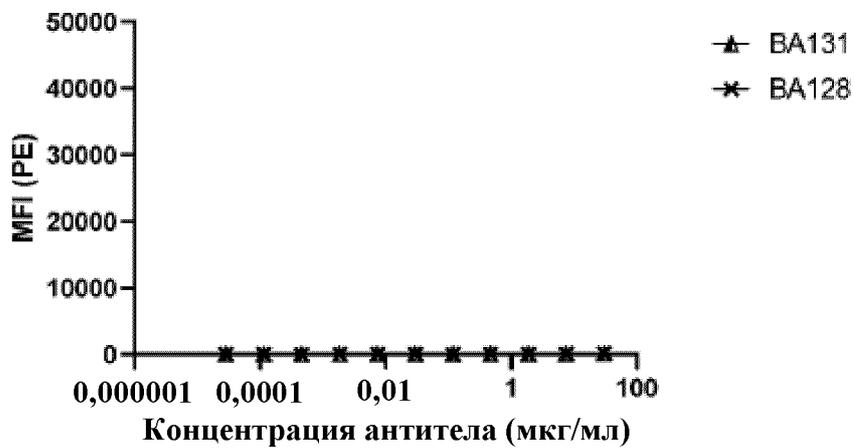
Фиг. 9С



Фиг. 9D

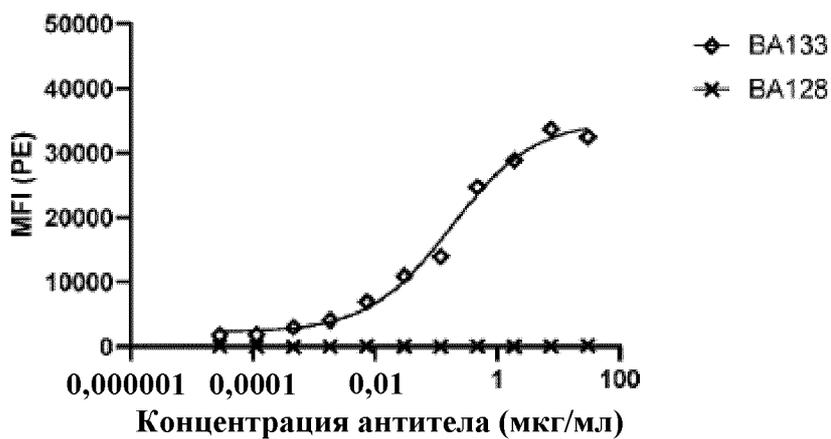


Фиг. 9E

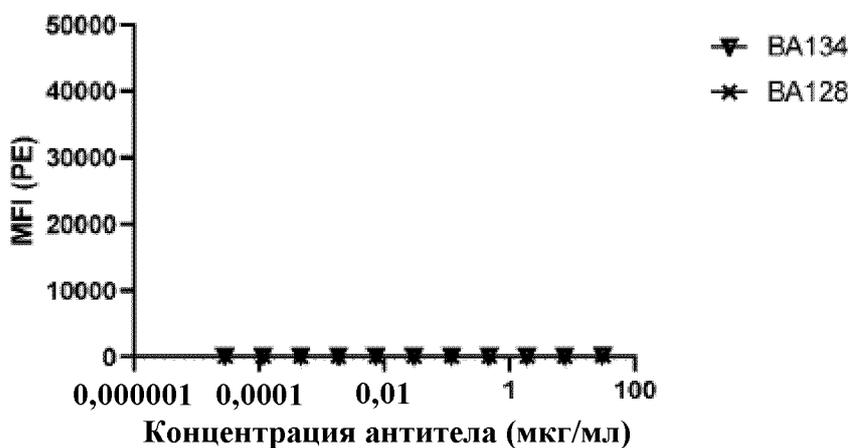


Фиг. 9F

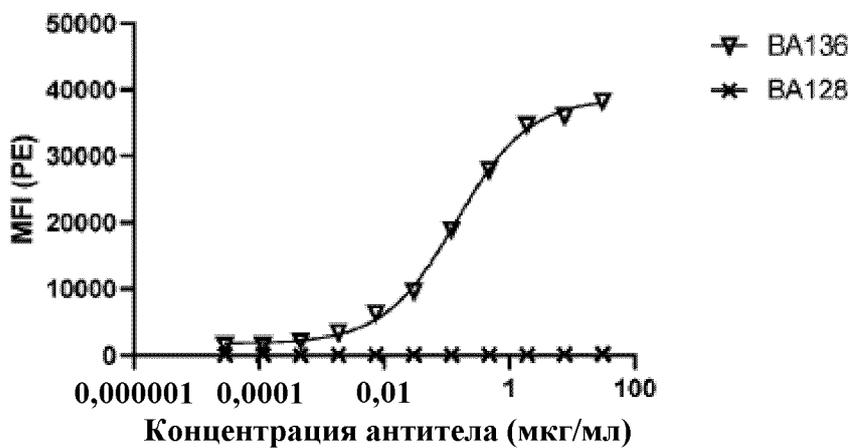
25/68



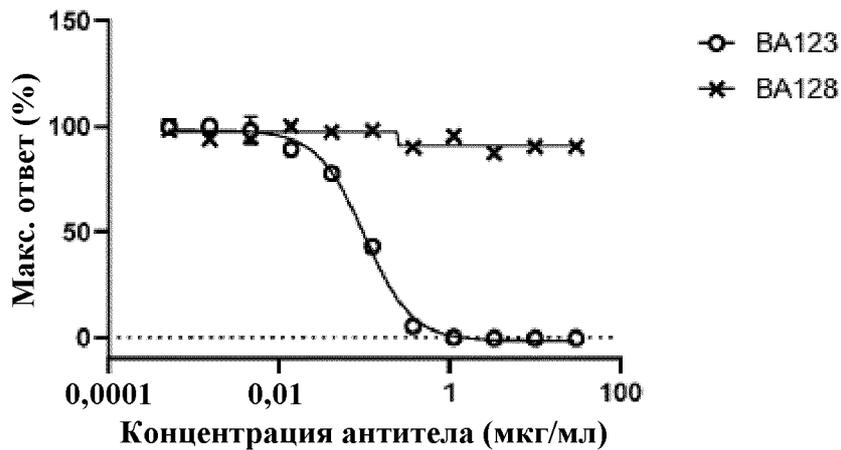
Фиг. 9G



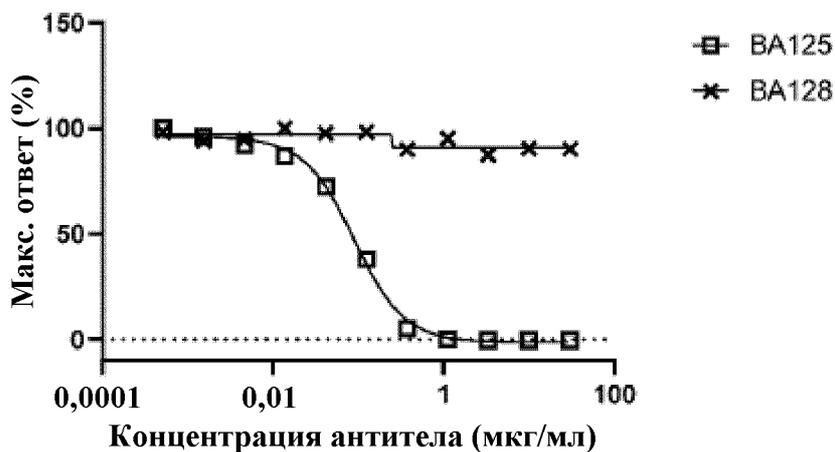
Фиг. 9H



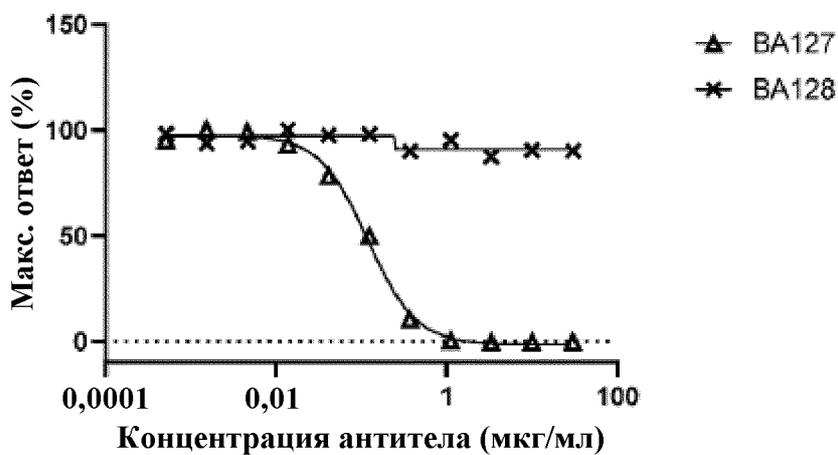
Фиг. 9I



Фиг. 10А

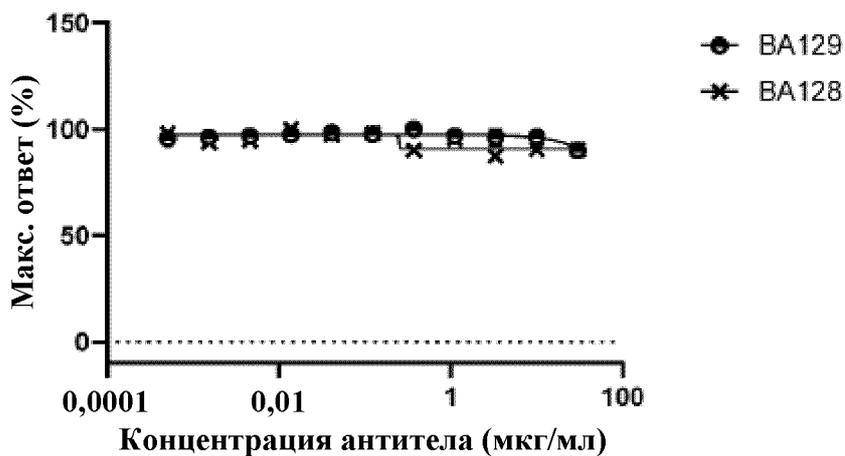


Фиг. 10В

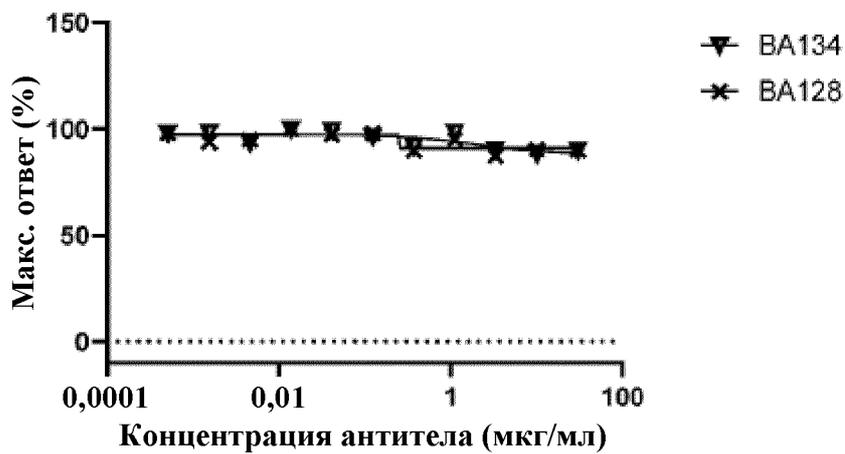


Фиг. 10С

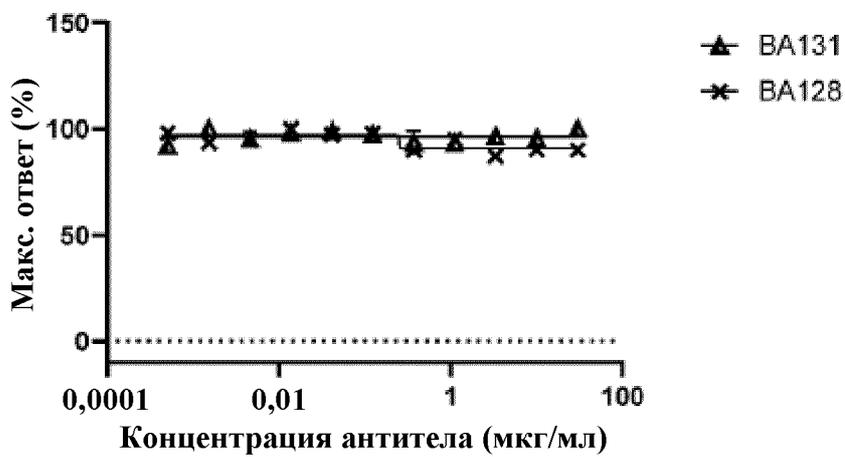
27/68



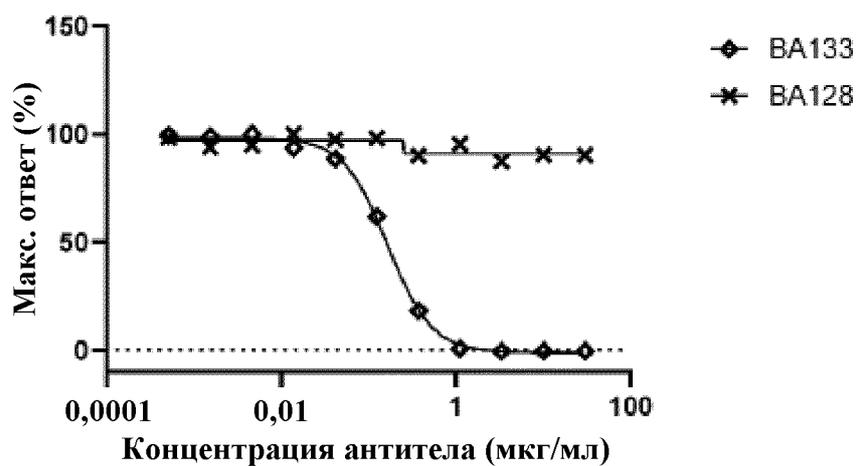
Фиг. 10D



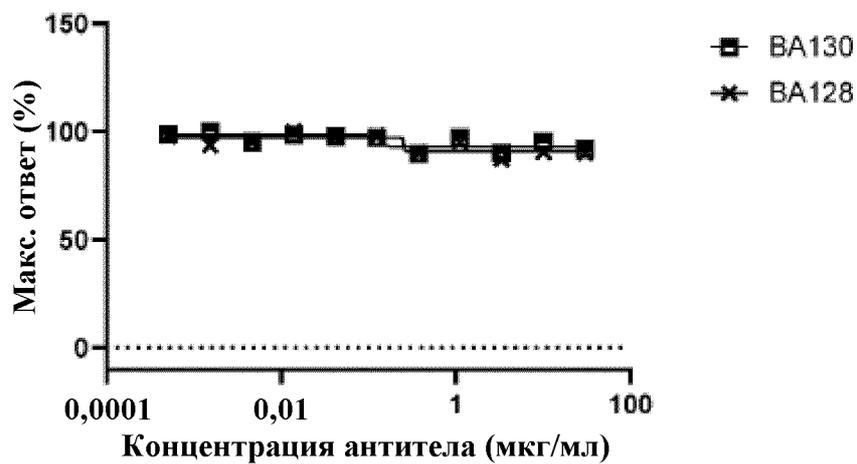
Фиг. 10E



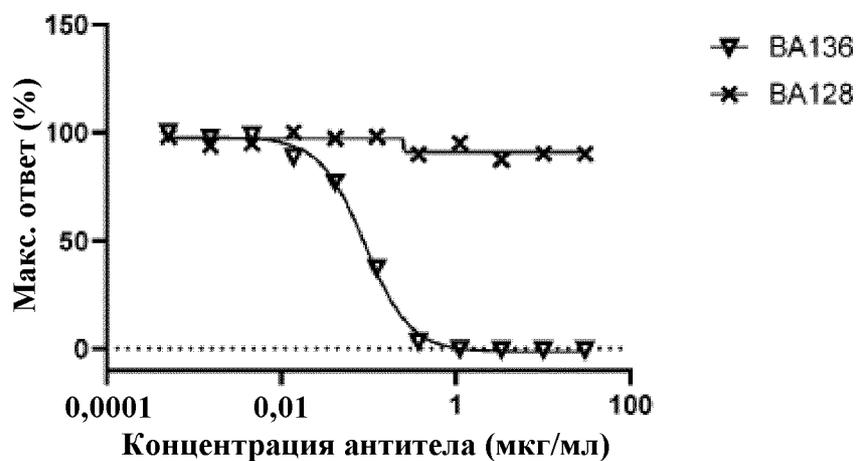
Фиг. 10F



Фиг. 10G

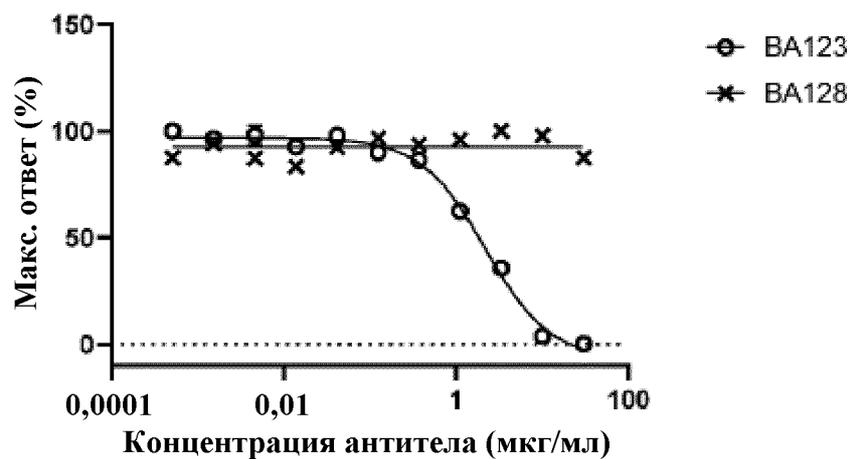


Фиг. 10H

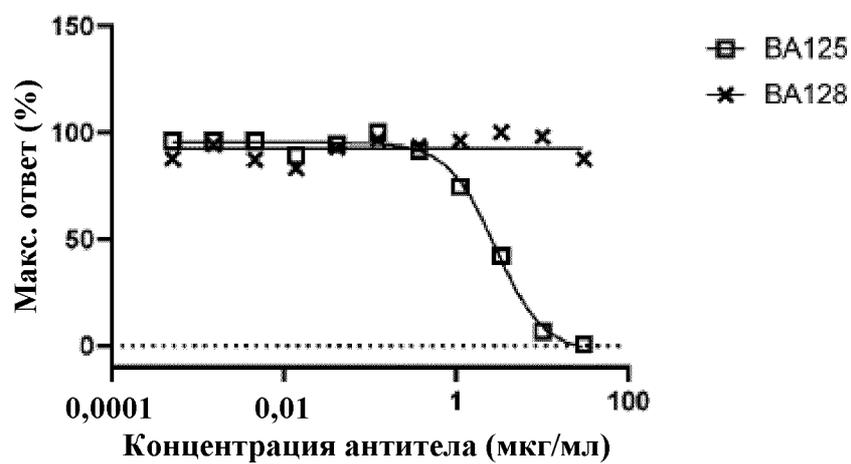


Фиг. 10I

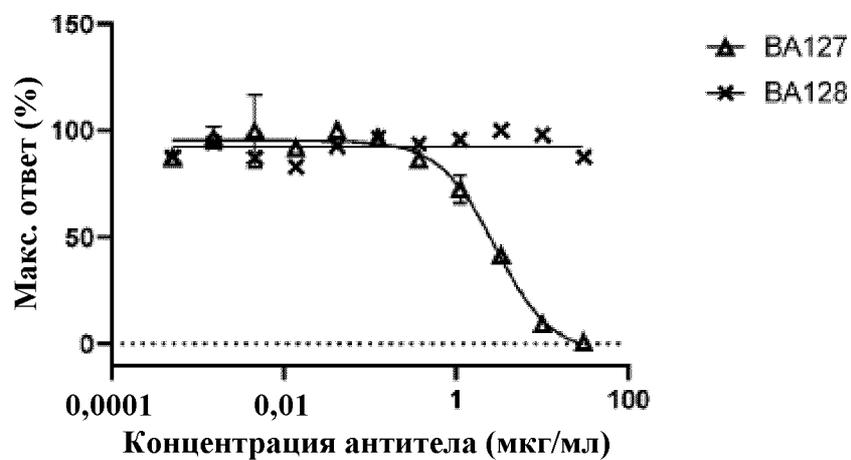
29/68



Фиг. 11А

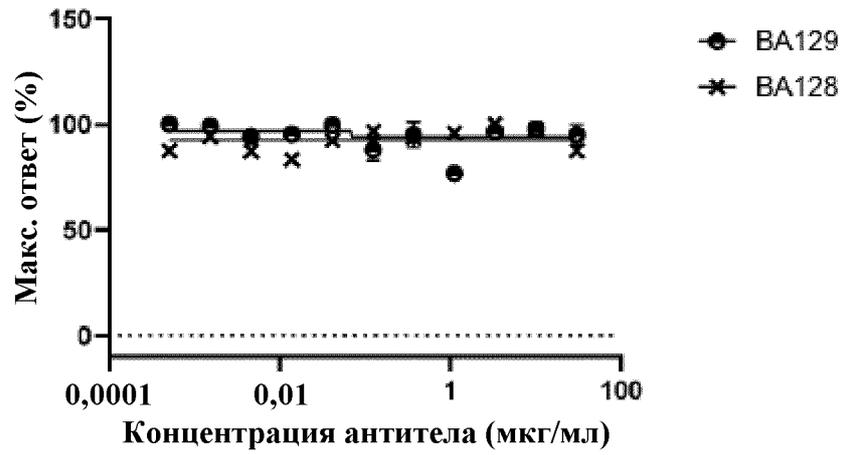


Фиг. 11В

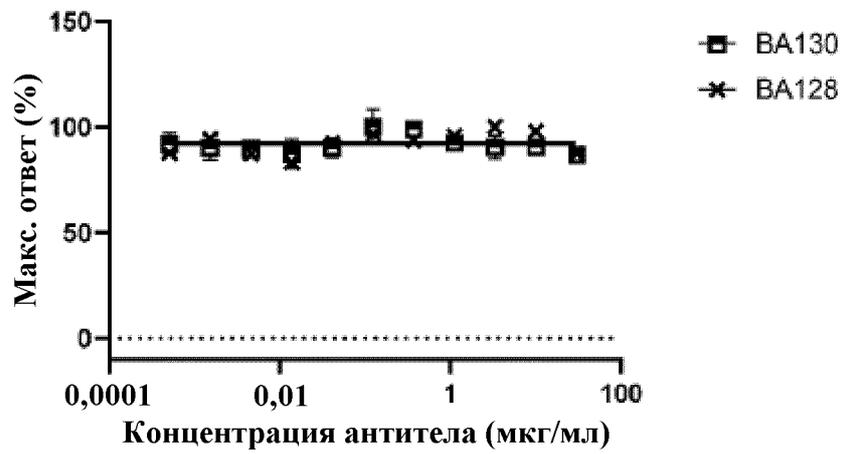


Фиг. 11С

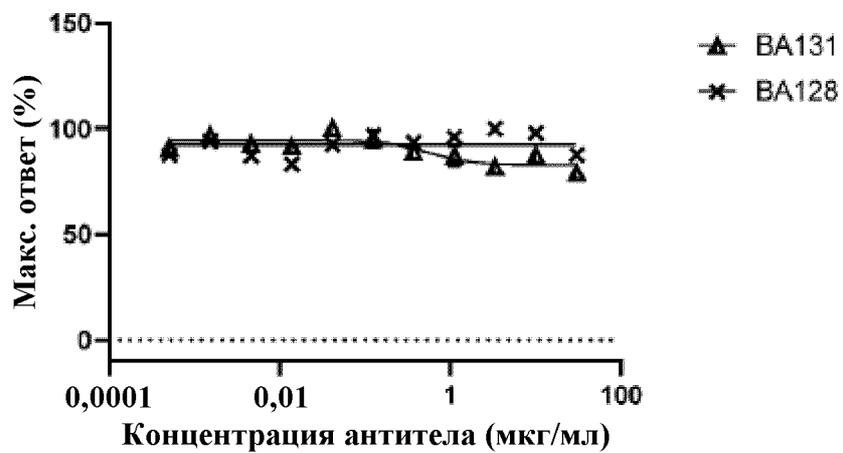
30/68



Фиг. 11D

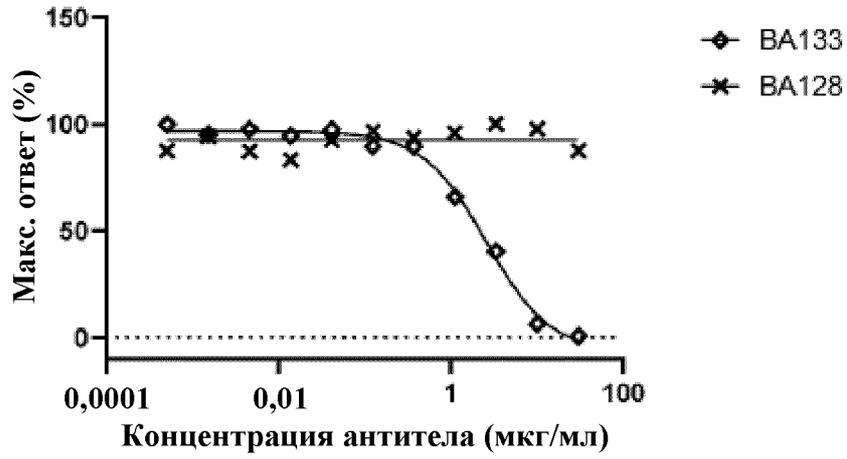


Фиг. 11E

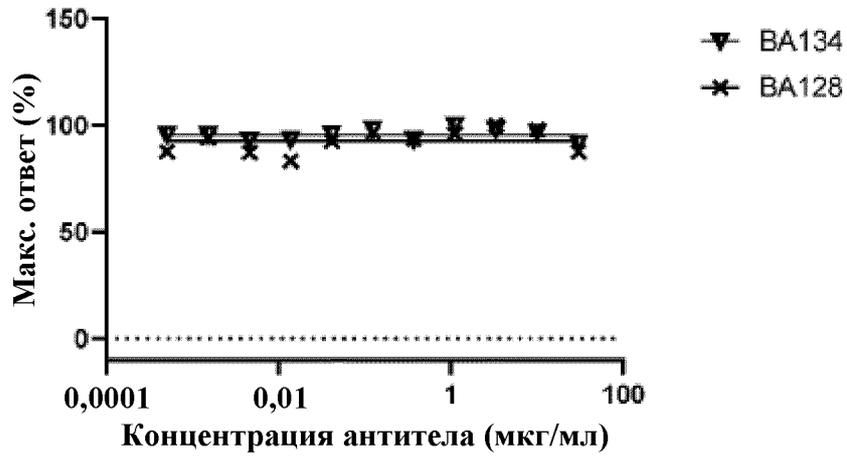


Фиг. 11F

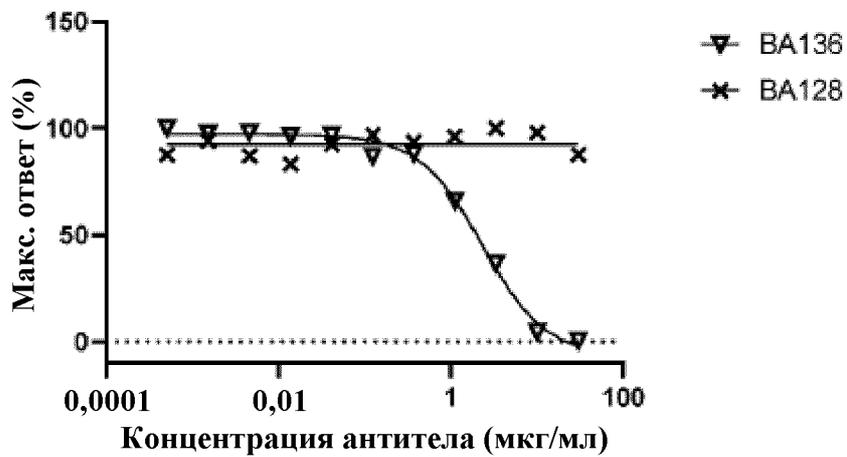
31/68



Фиг. 11G

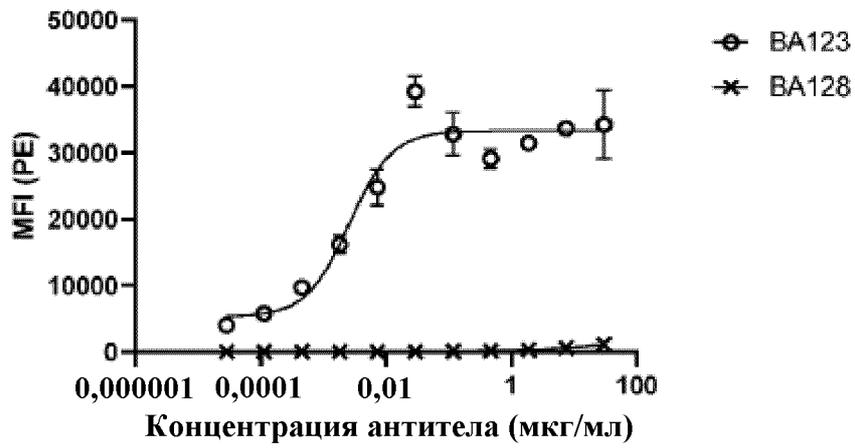


Фиг. 11H

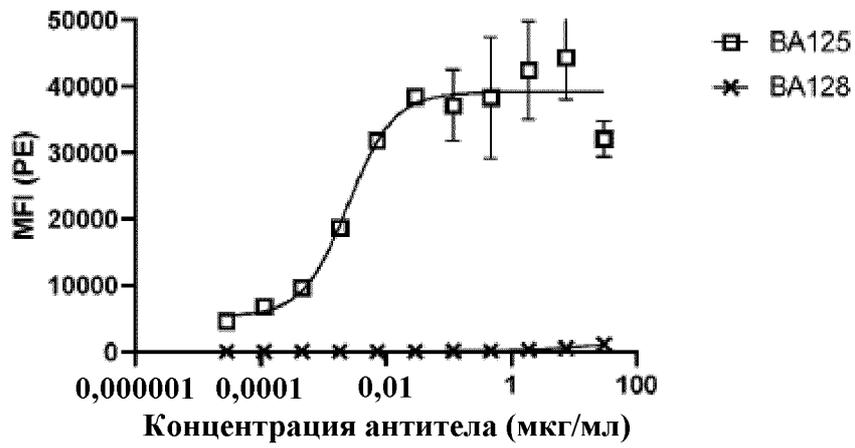


Фиг. 11I

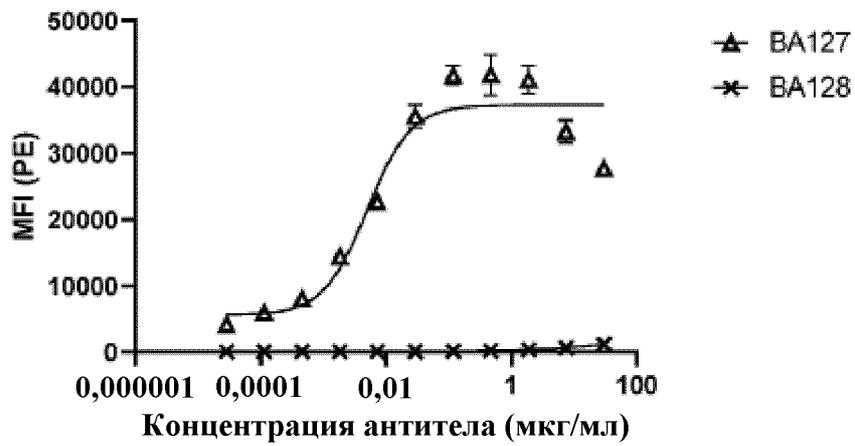
32/68



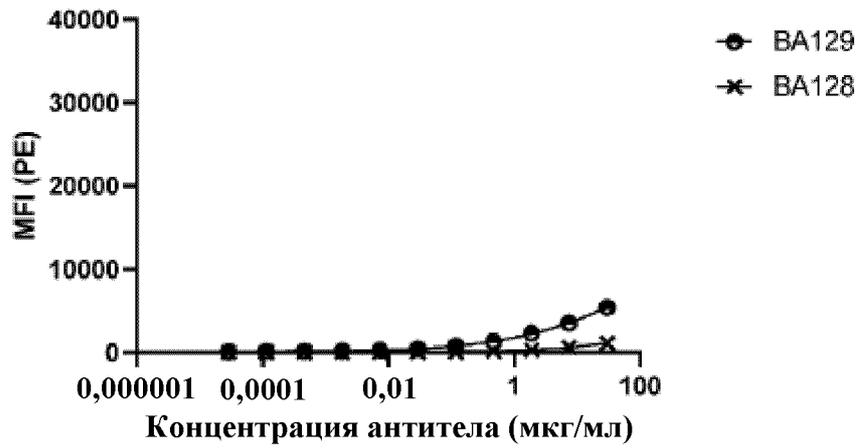
Фиг. 12А



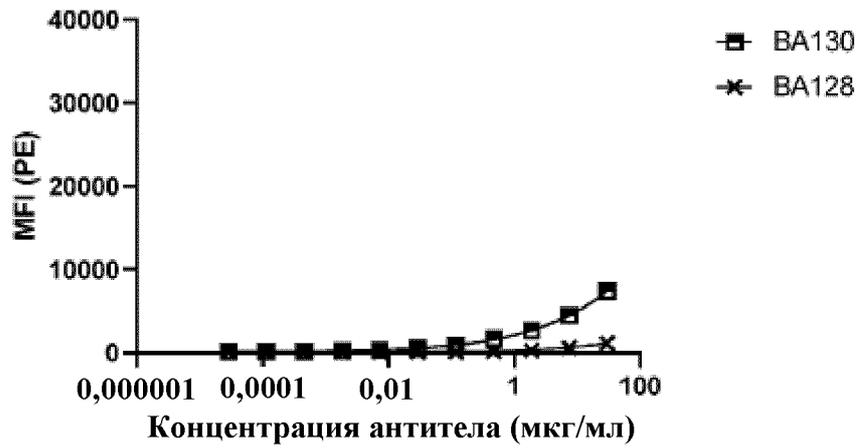
Фиг. 12В



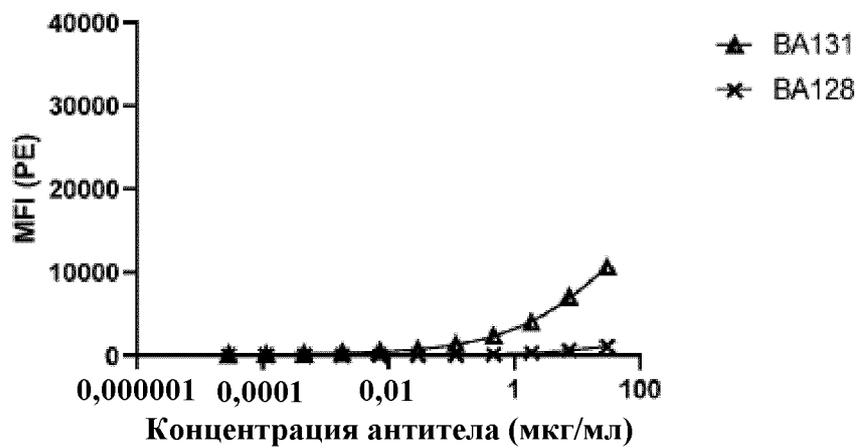
Фиг. 12С



Фиг. 12D

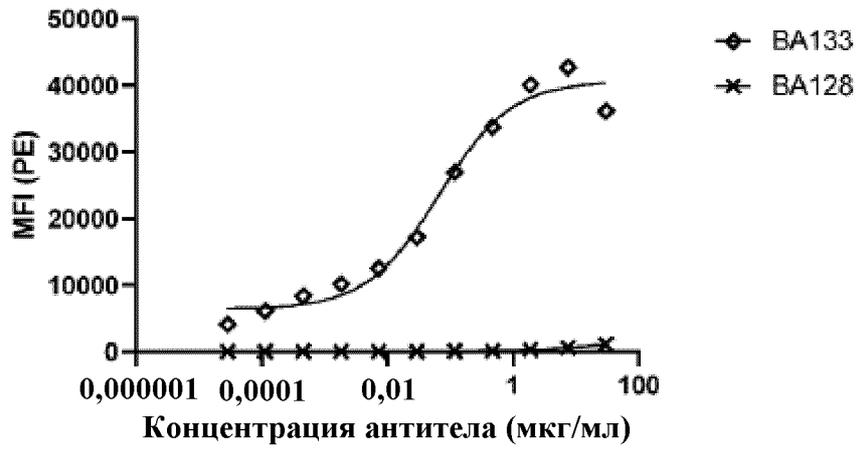


Фиг. 12E

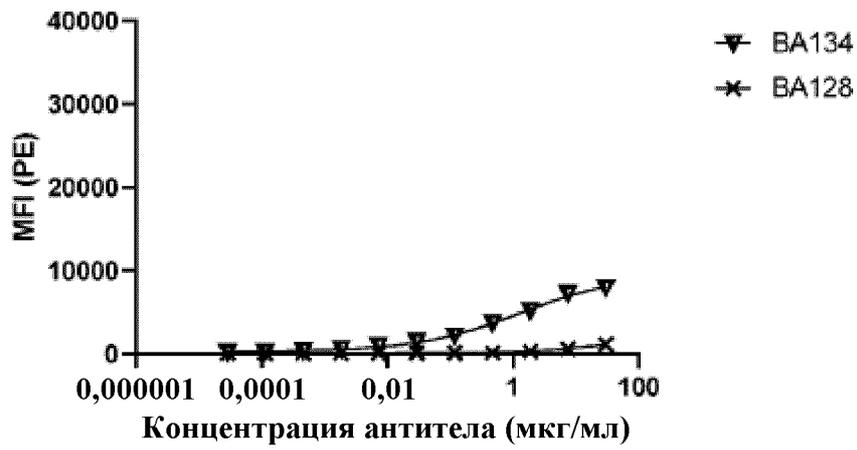


Фиг. 12F

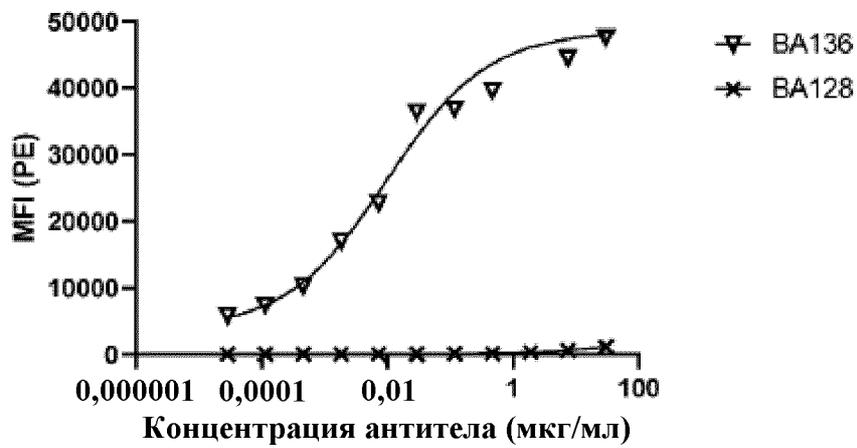
34/68



Фиг. 12G

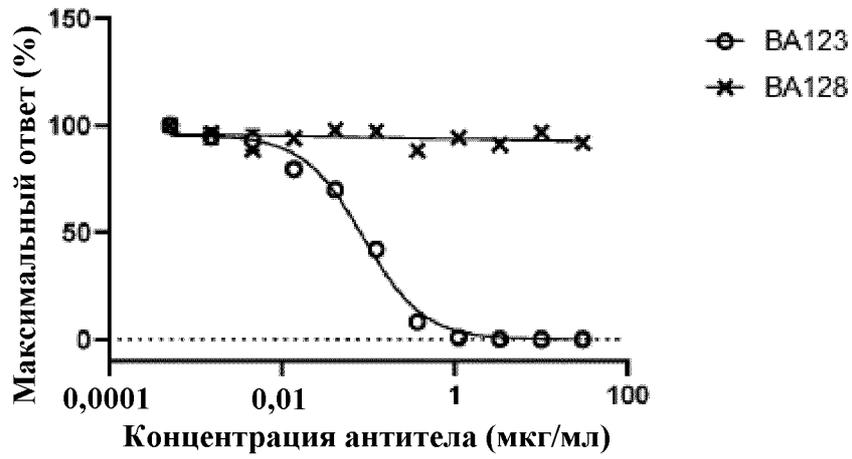


Фиг. 12H

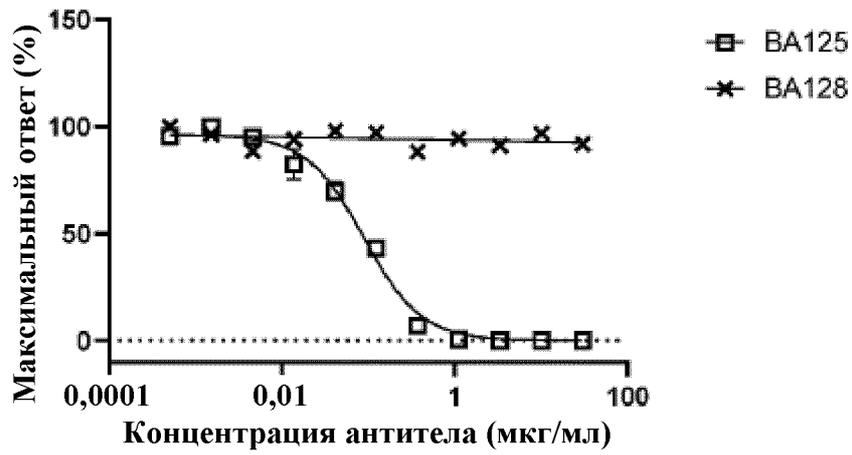


Фиг. 12I

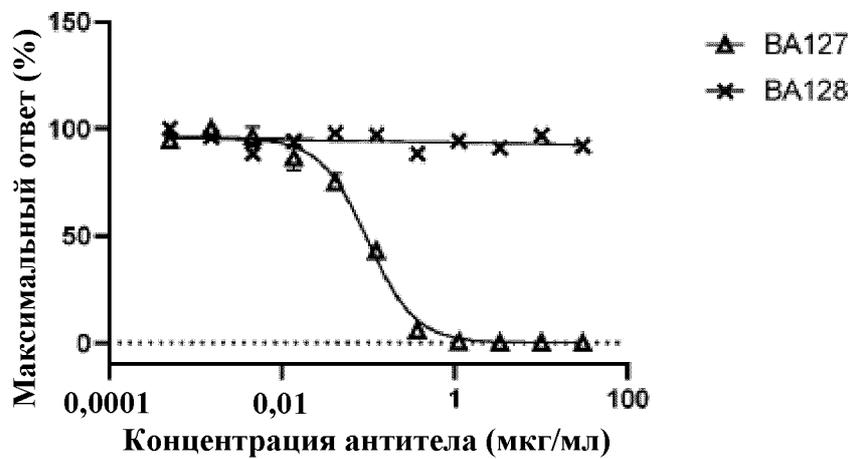
35/68



Фиг. 13А

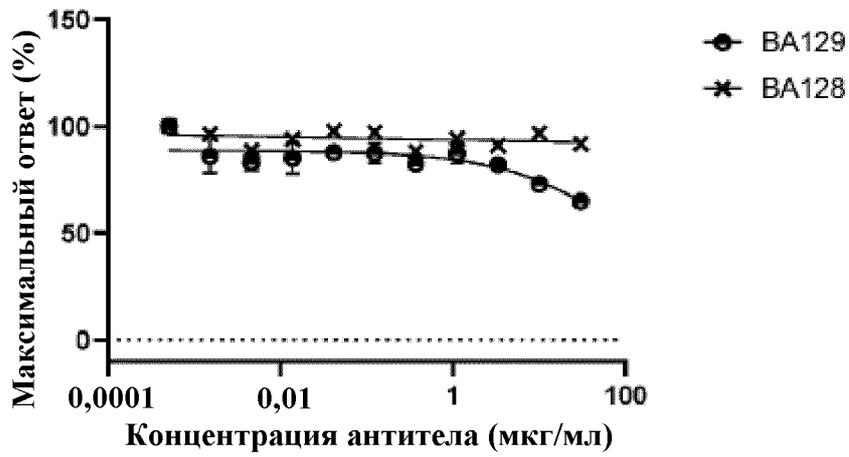


Фиг. 13В

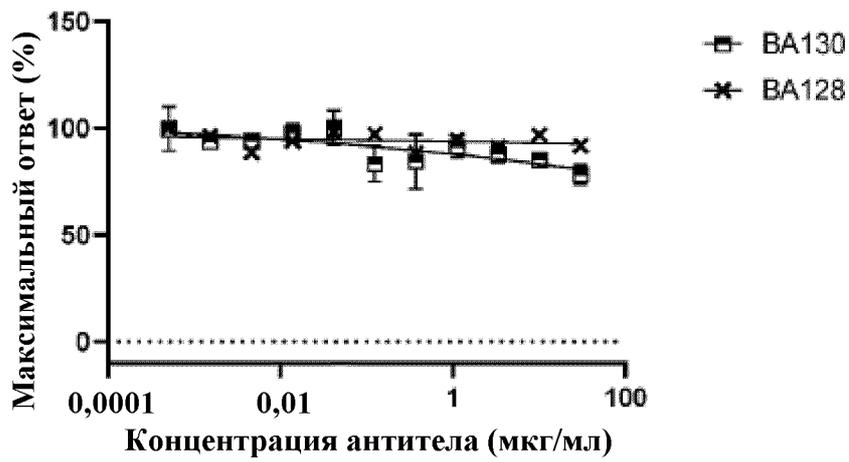


Фиг. 13С

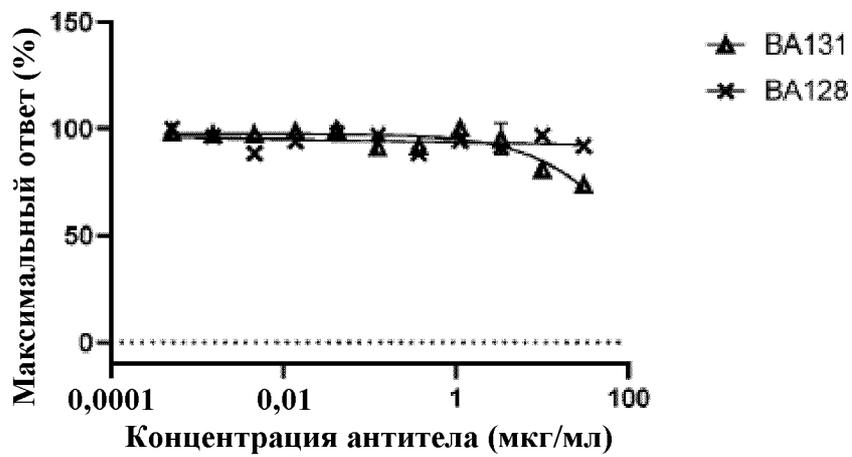
36/68



Фиг. 13D

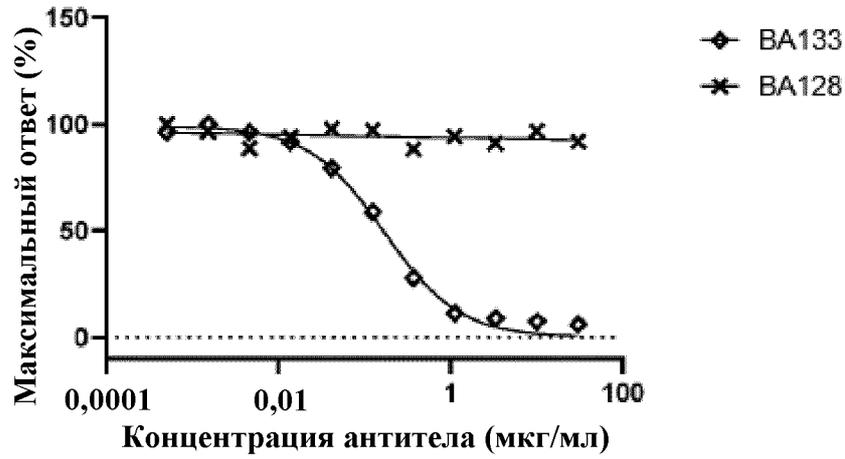


Фиг. 13E

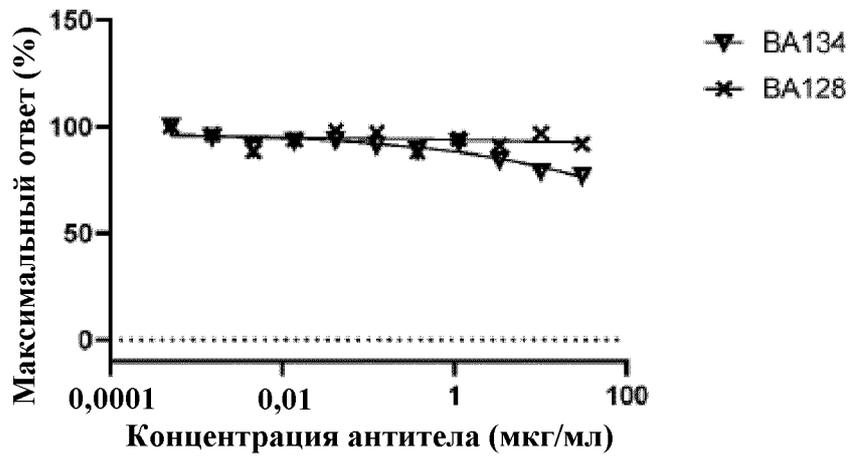


Фиг. 13F

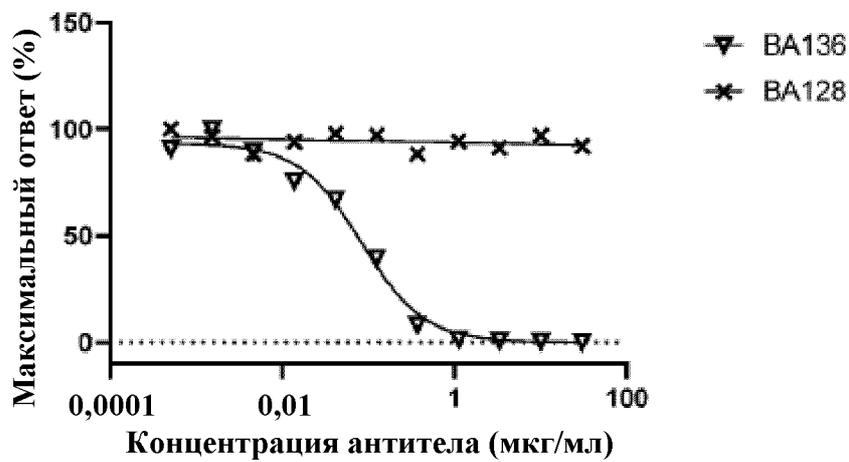
37/68



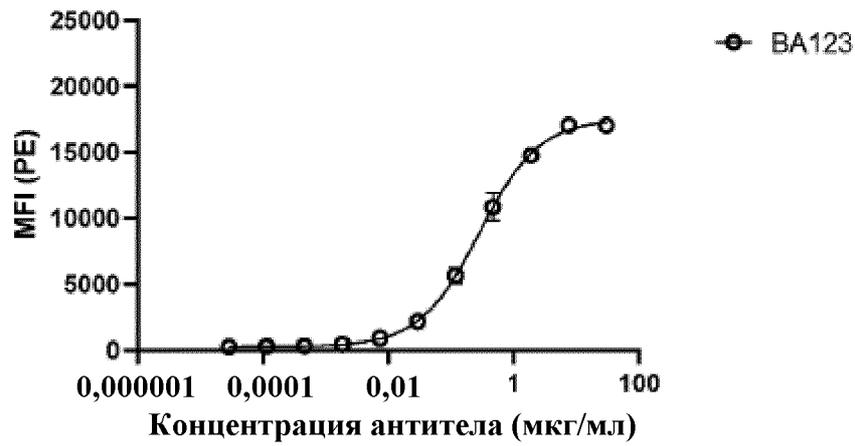
Фиг. 13G



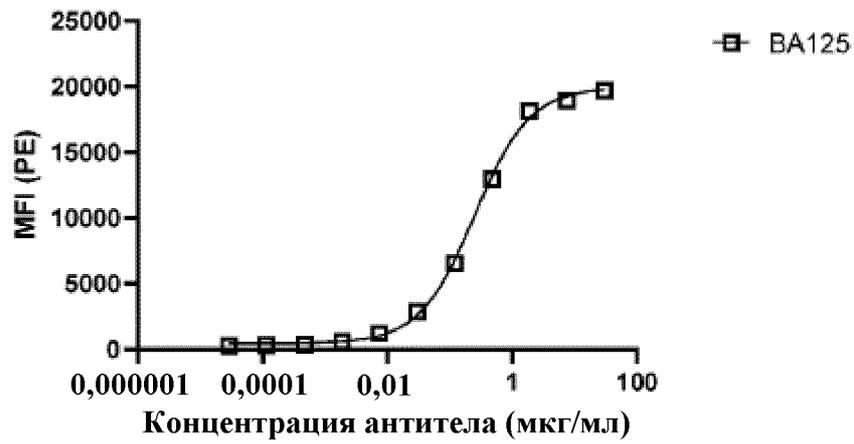
Фиг. 13H



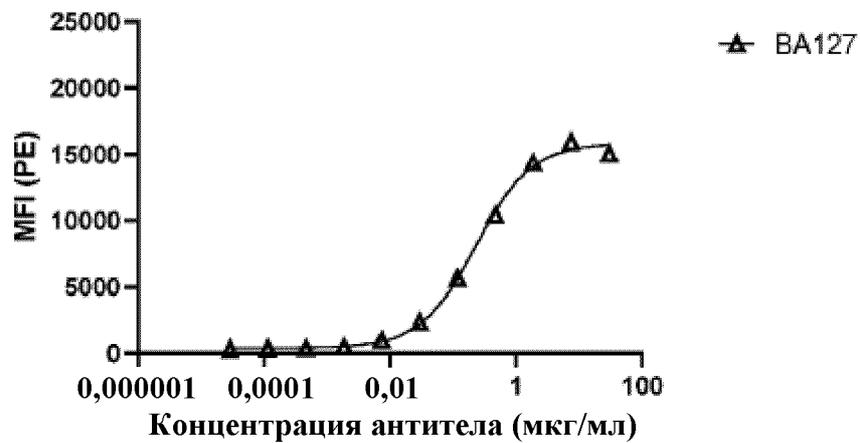
Фиг. 13I



Фиг. 14А

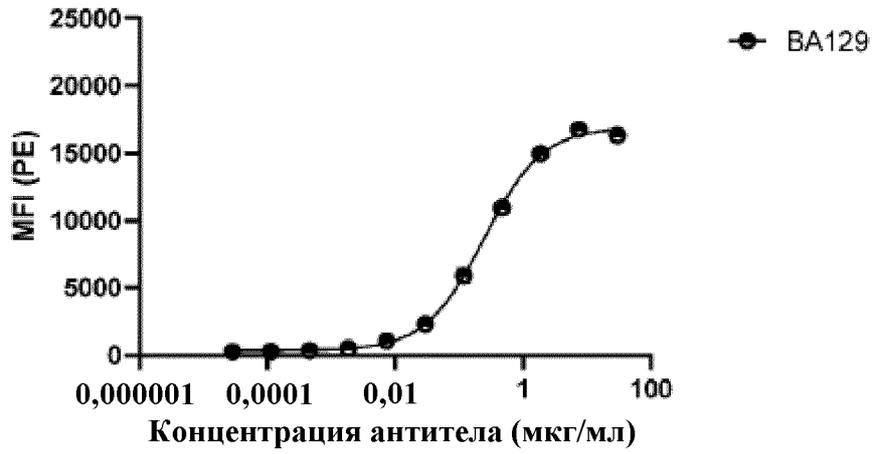


Фиг. 14В

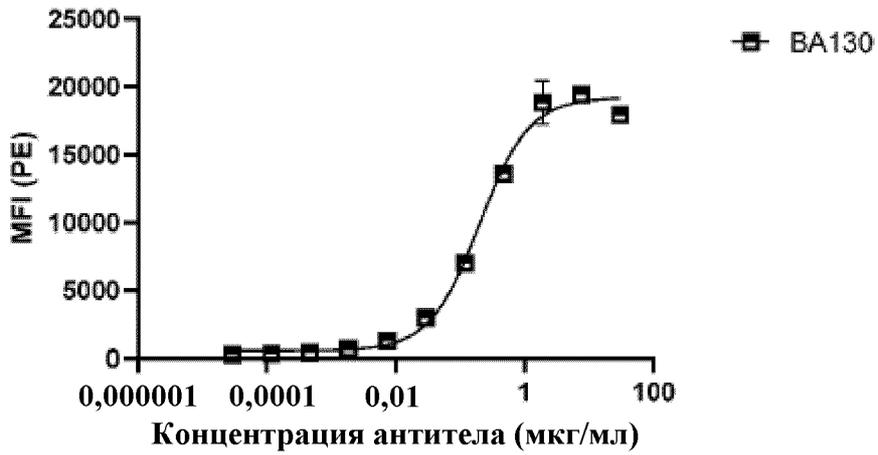


Фиг. 14С

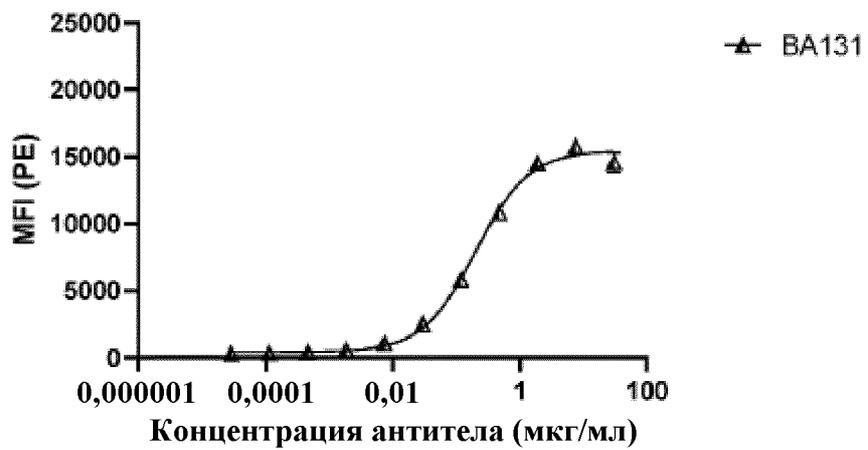
39/68



Фиг. 14D

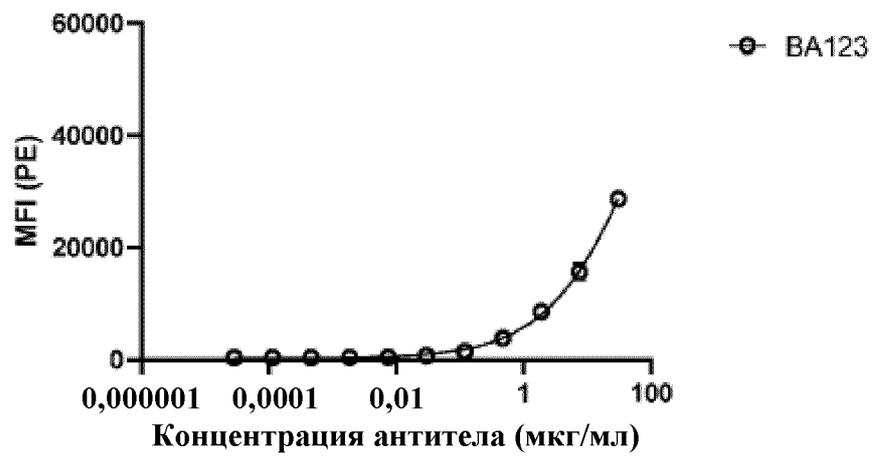


Фиг. 14E

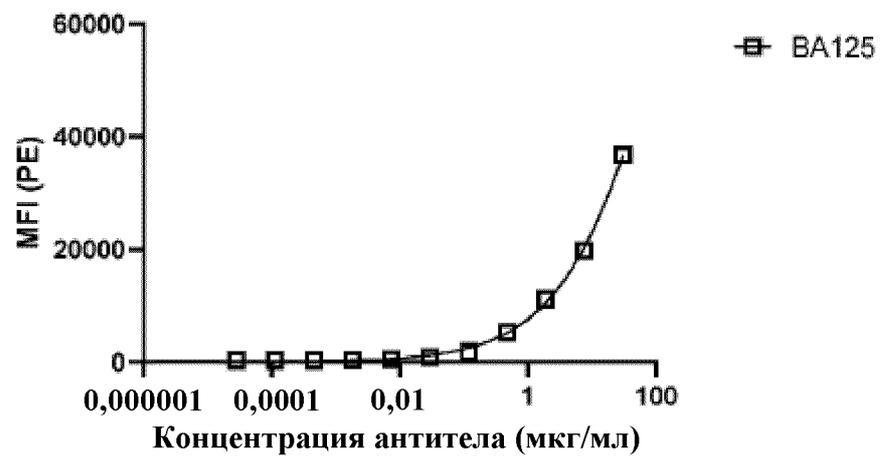


Фиг. 14F

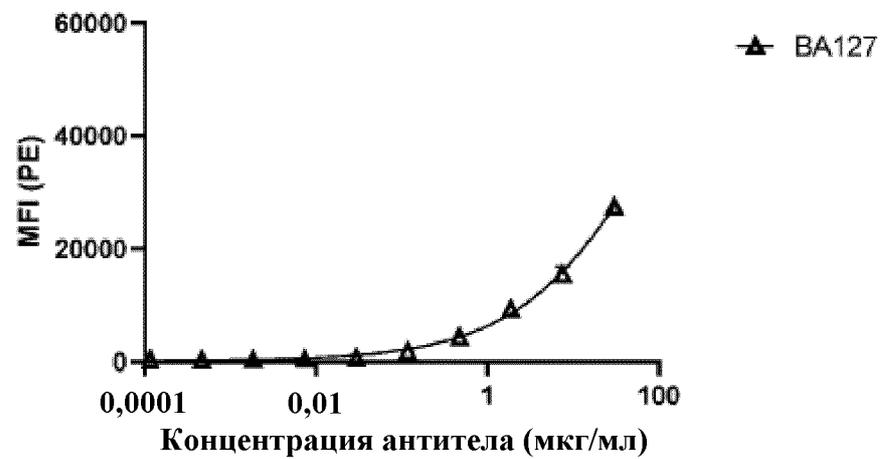
40/68



Фиг. 15А

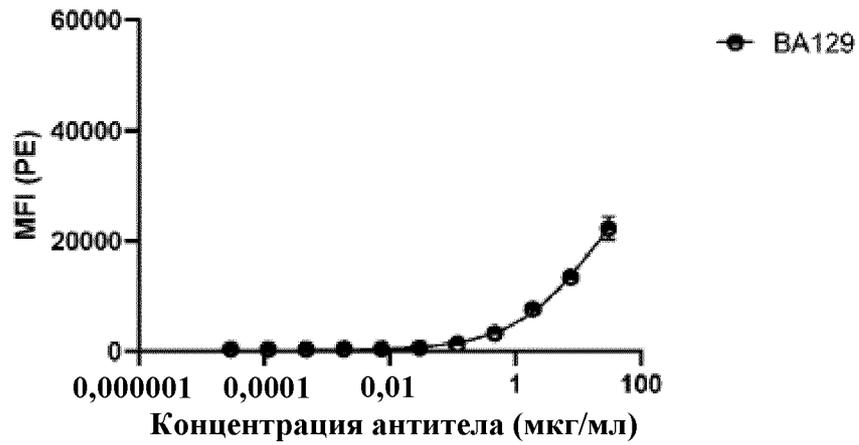


Фиг. 15В

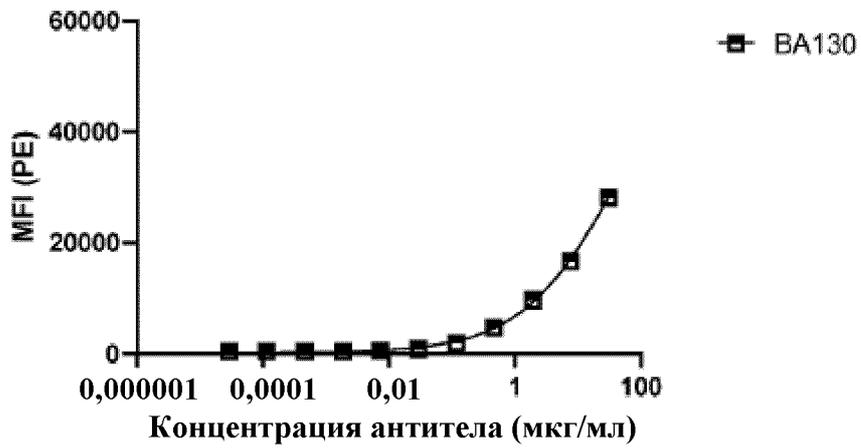


Фиг. 15С

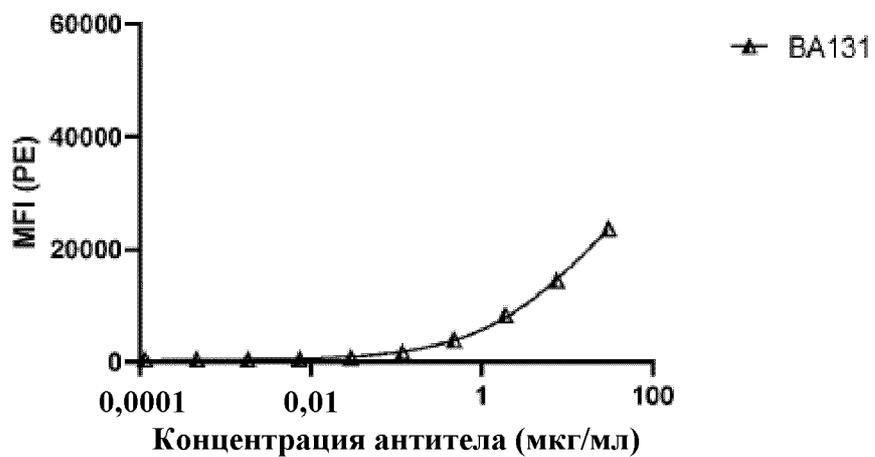
41/68



Фиг. 15D

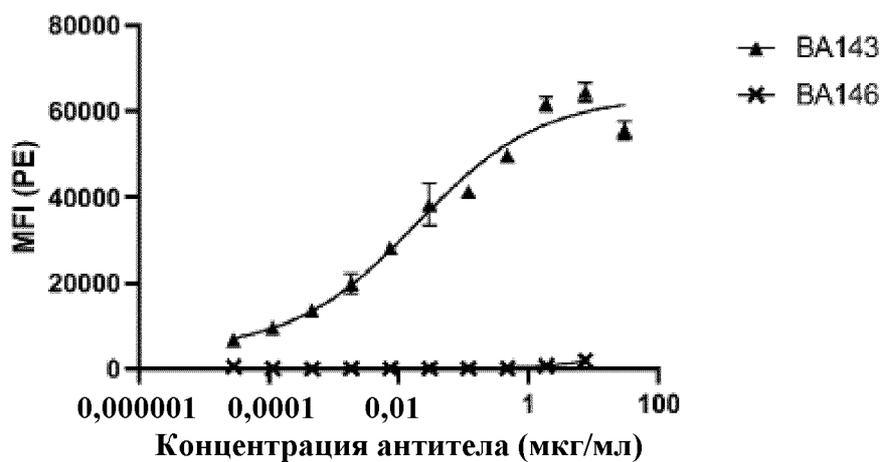


Фиг. 15E

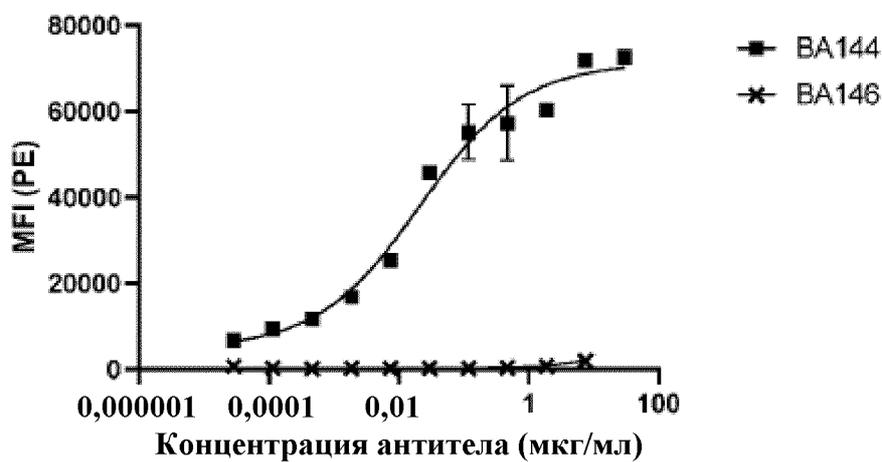


Фиг. 15F

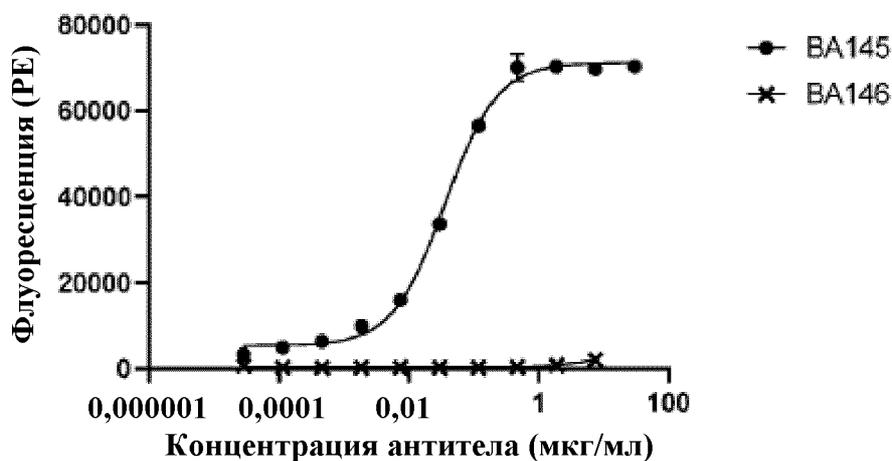
42/68



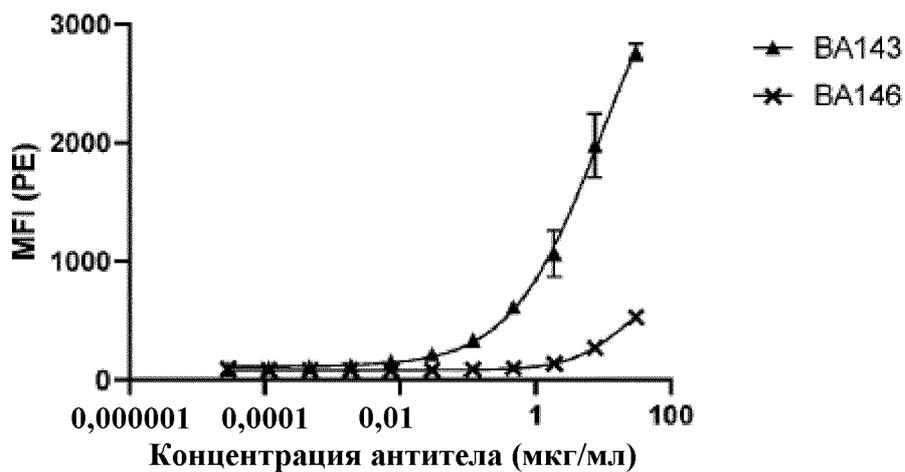
Фиг. 16А



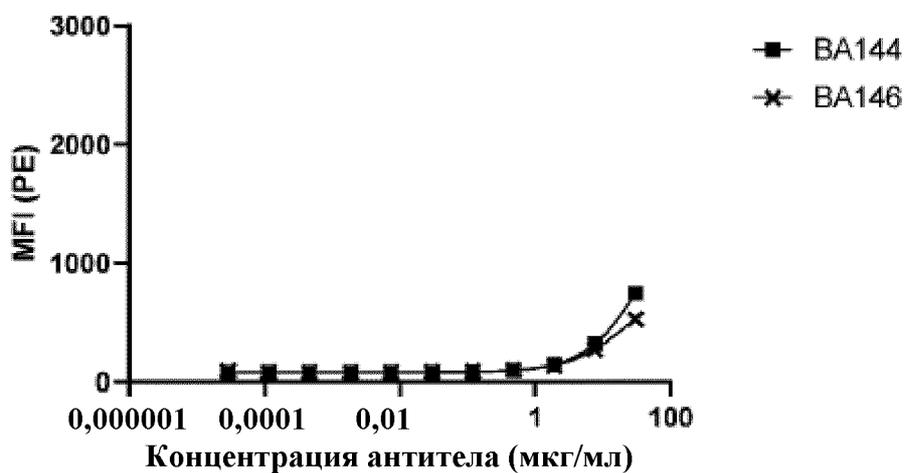
Фиг. 16В



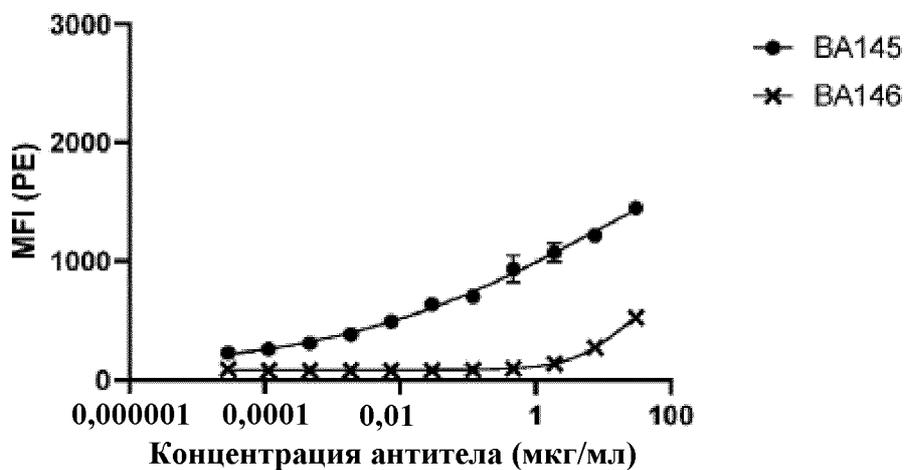
Фиг. 16С



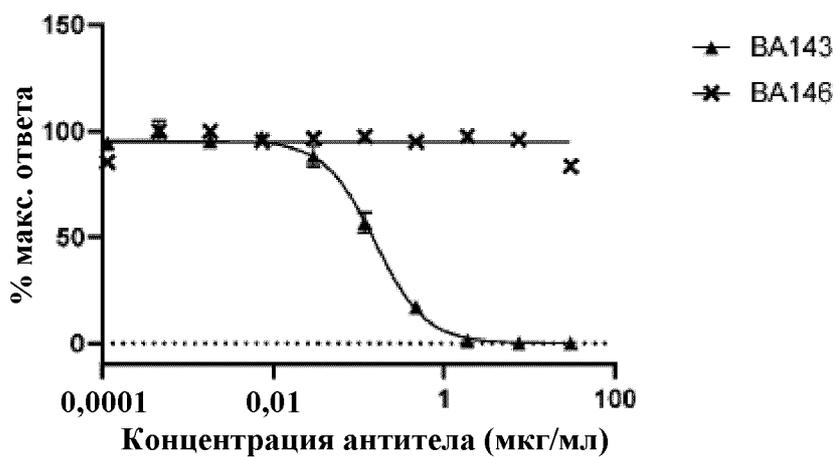
Фиг. 17А



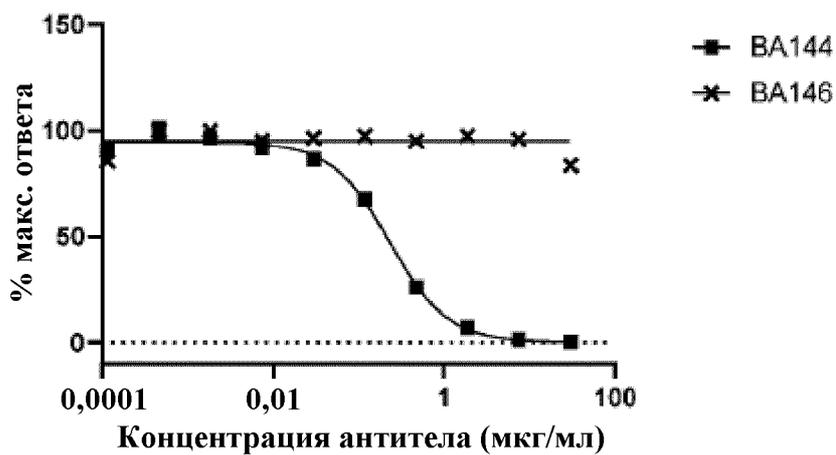
Фиг. 17В



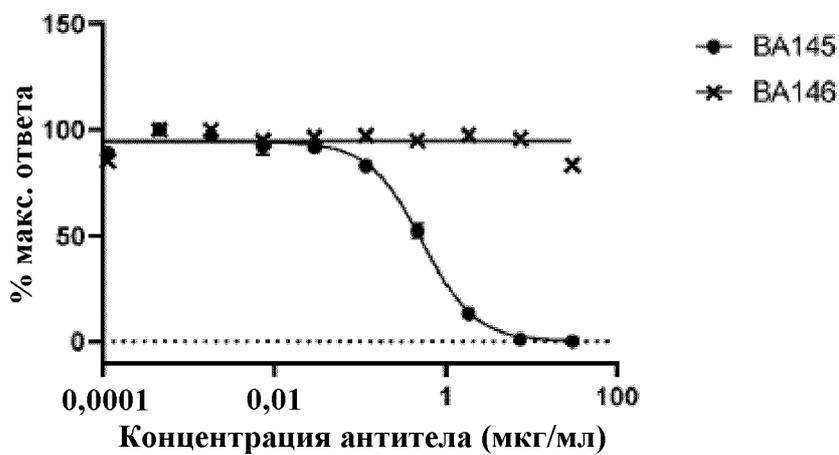
Фиг. 17С



Фиг. 18А

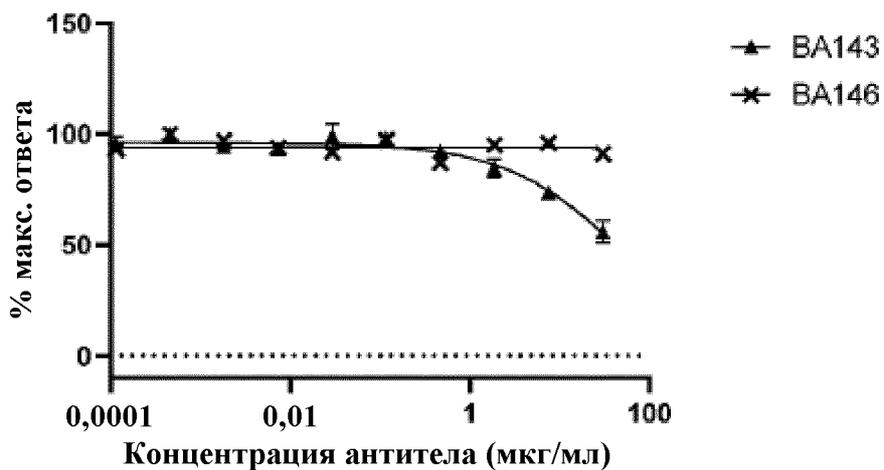


Фиг. 18В

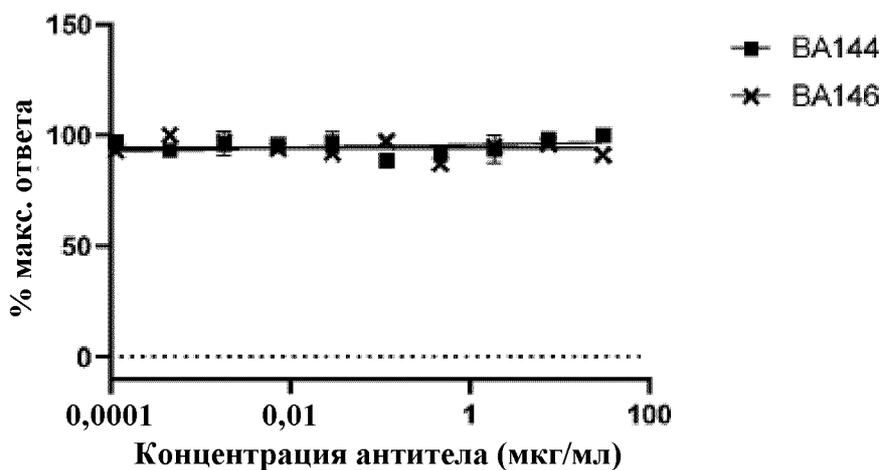


Фиг. 18С

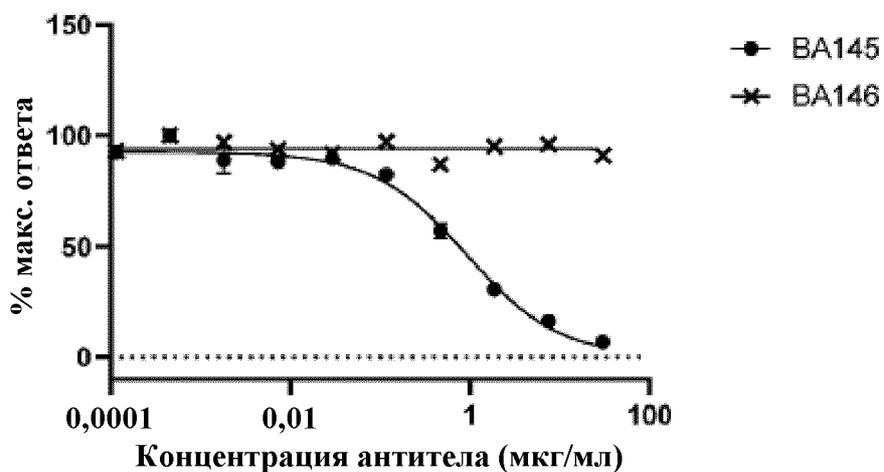
45/68



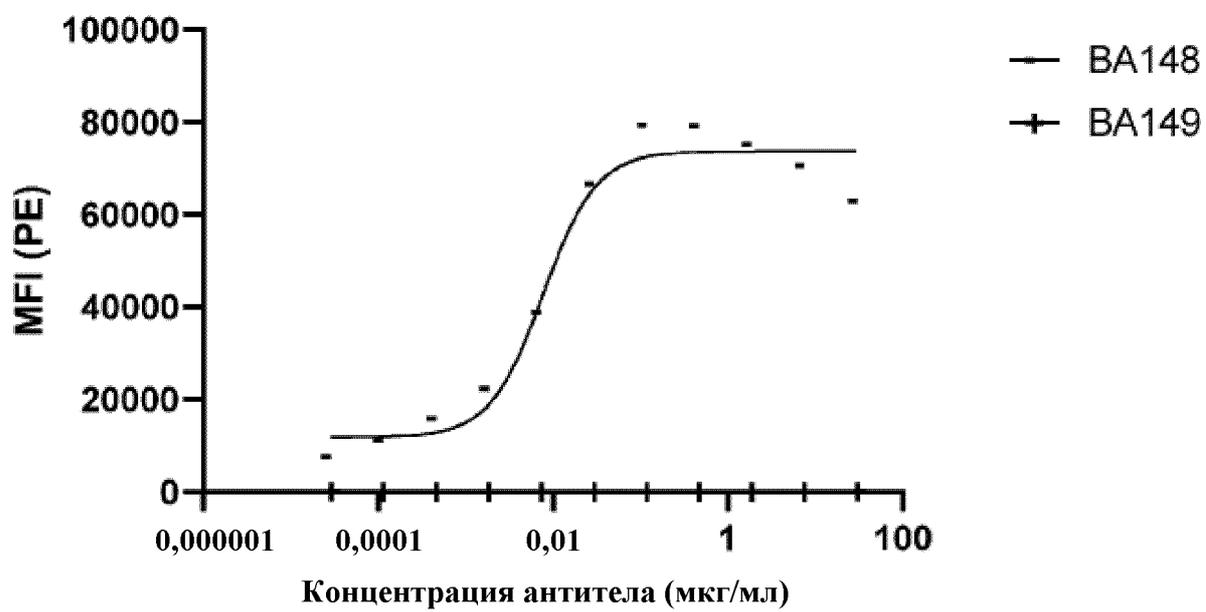
Фиг. 19А



Фиг. 19В

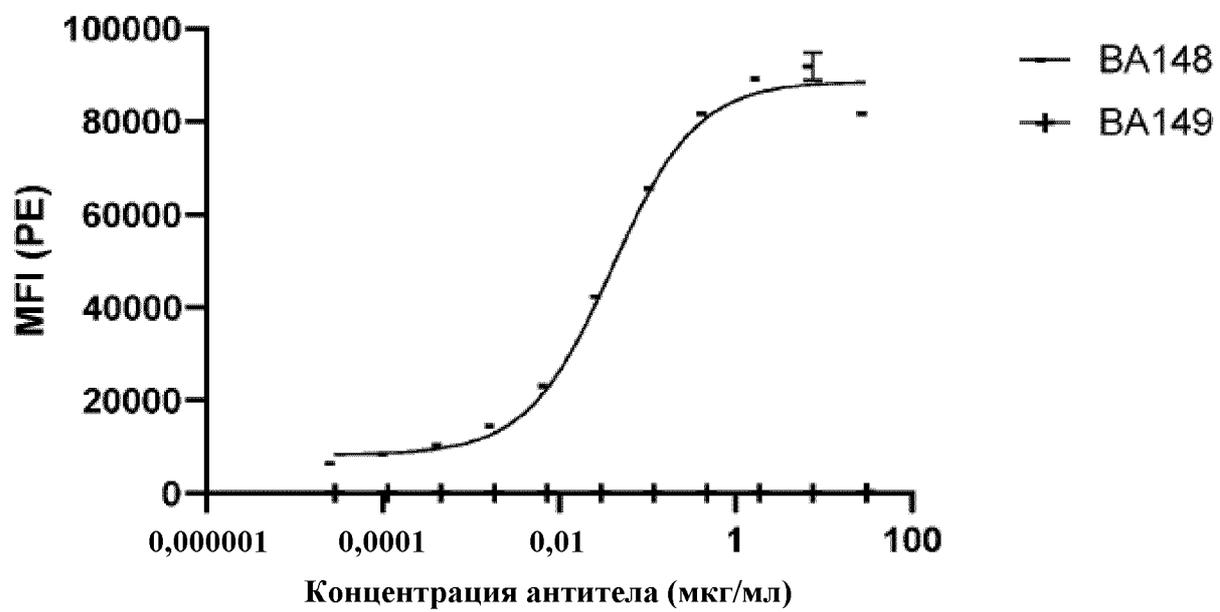


Фиг. 19С

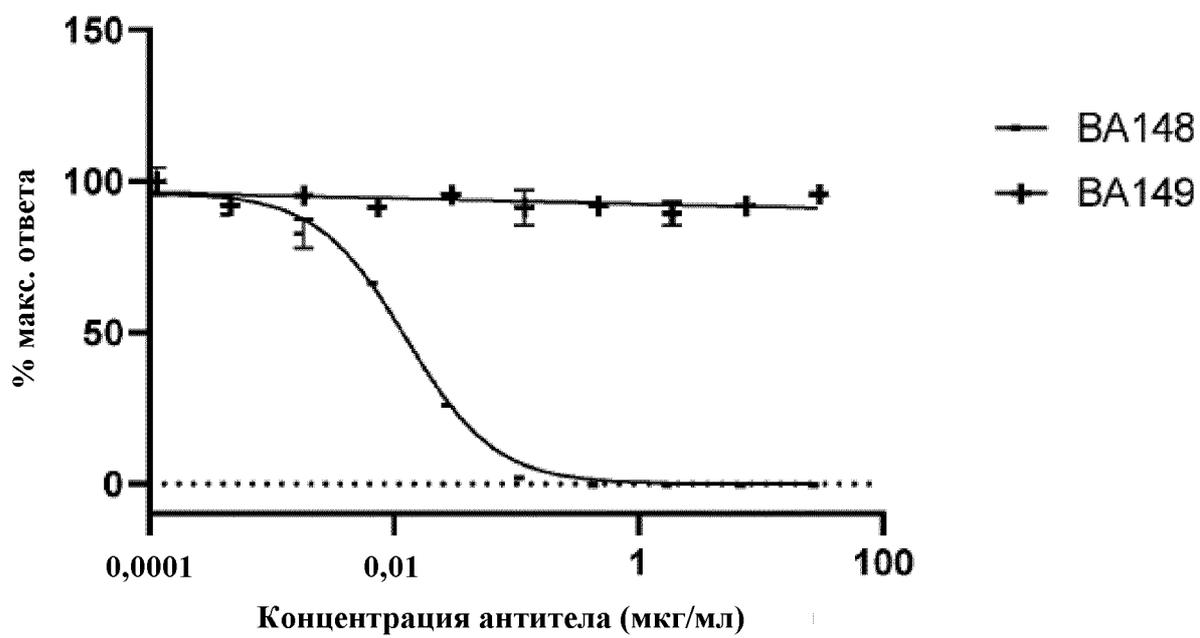


Фиг. 20

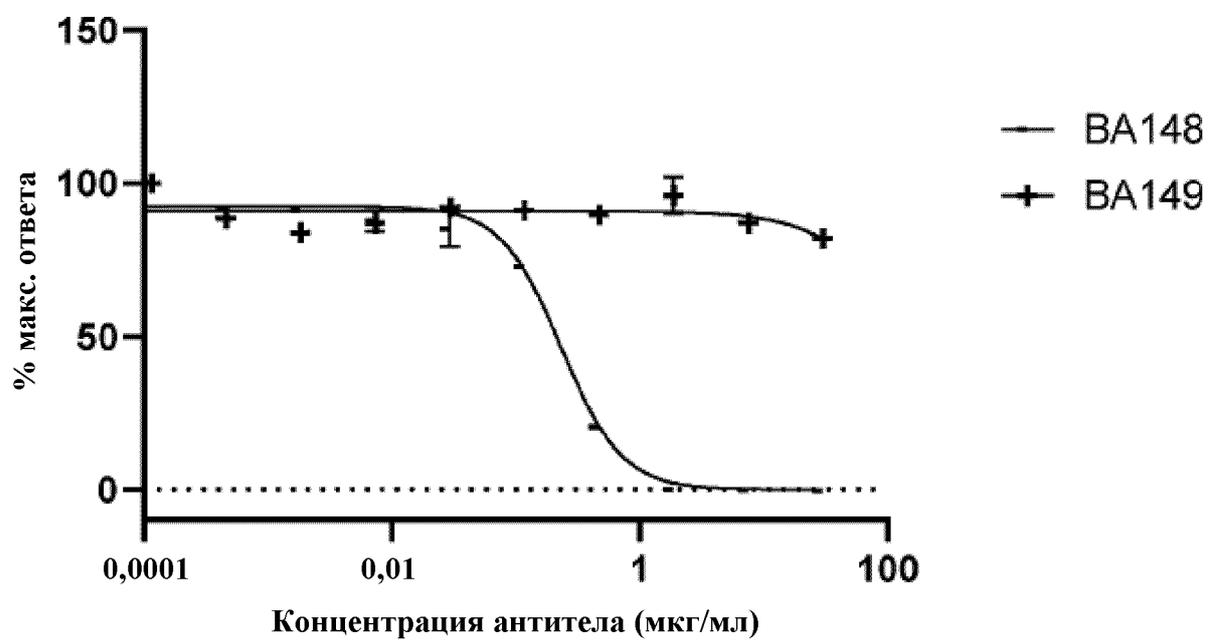
47/68



Фиг. 21

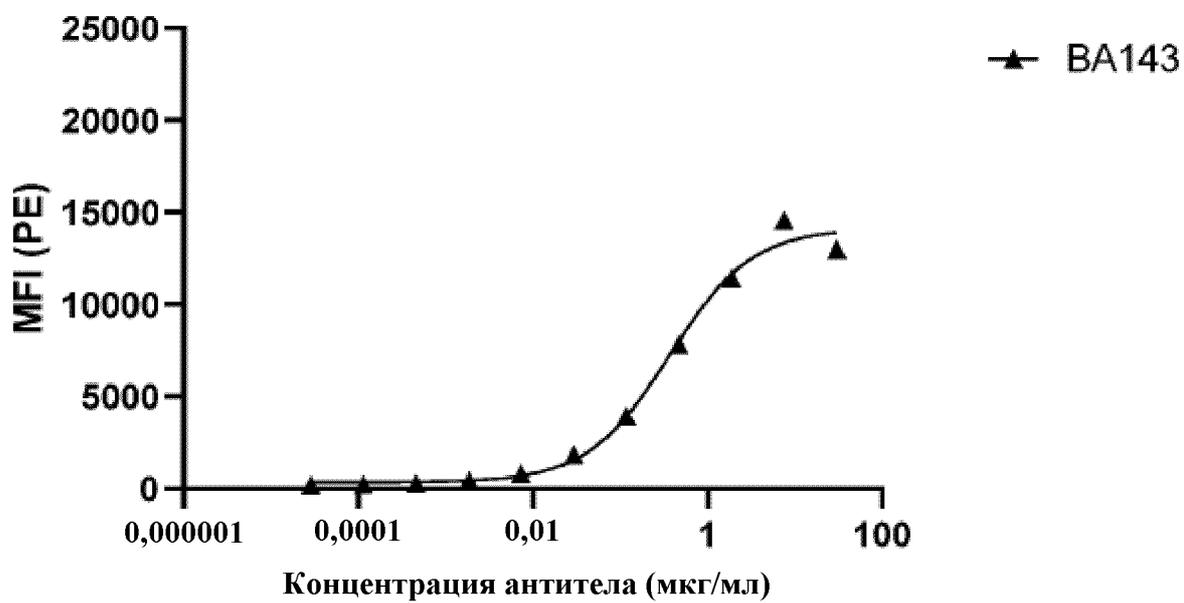


Фиг. 22

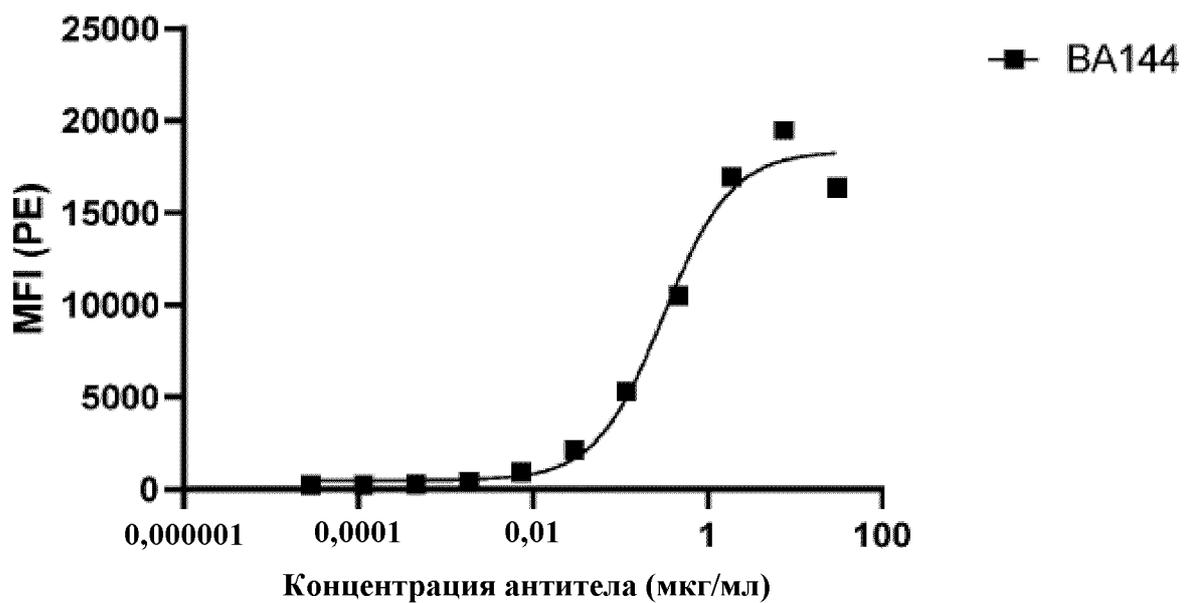


Фиг. 23

50/68

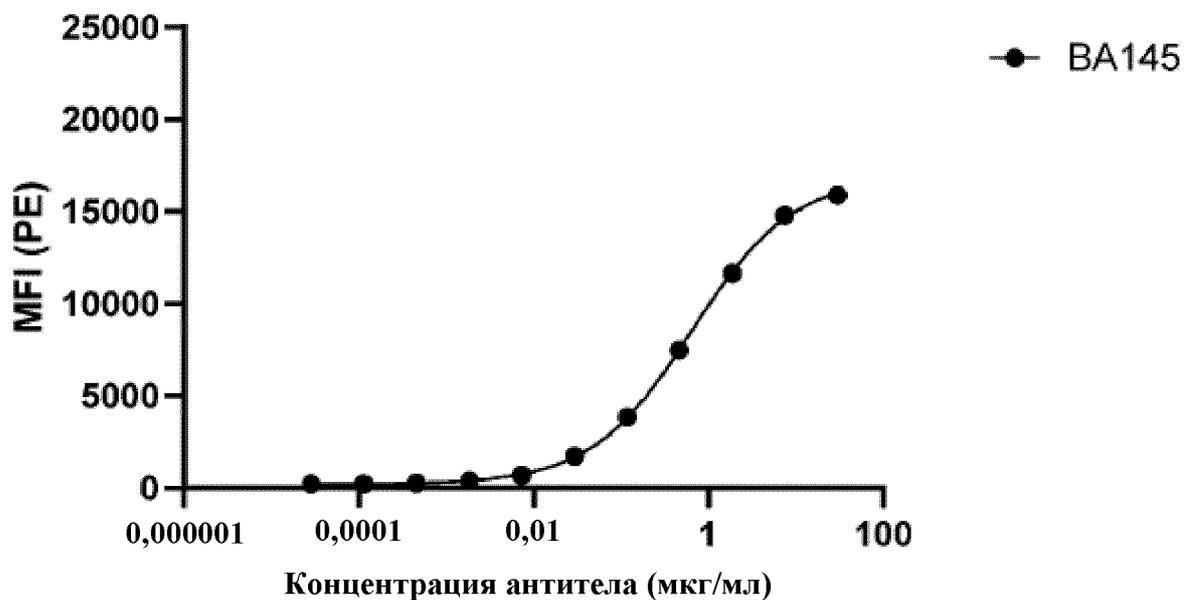


Фиг. 24А

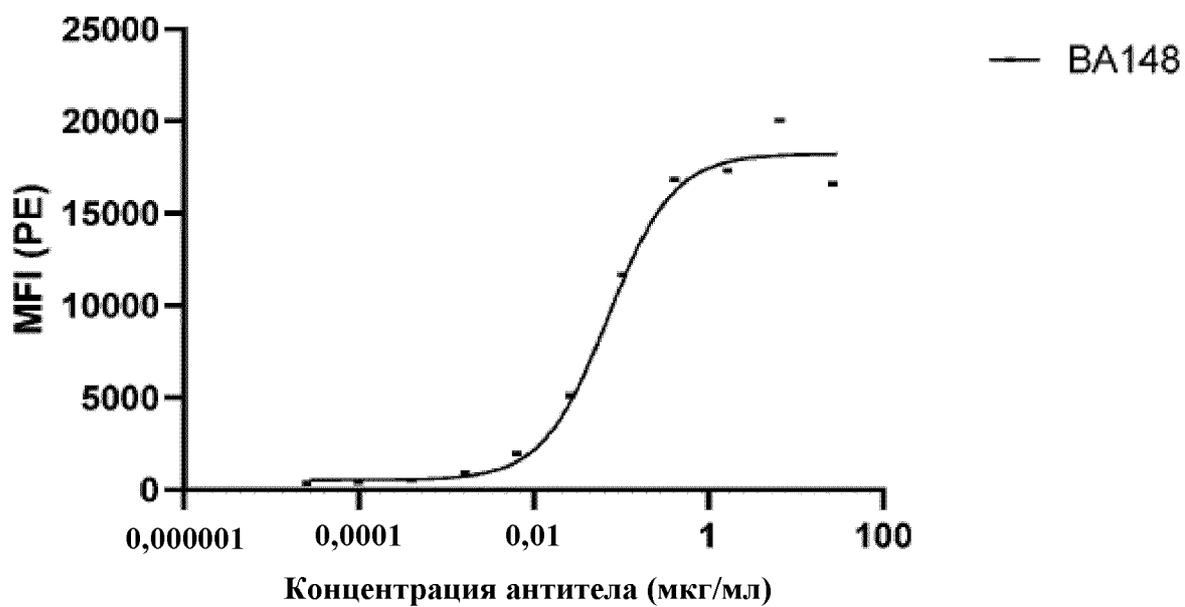


Фиг. 24В

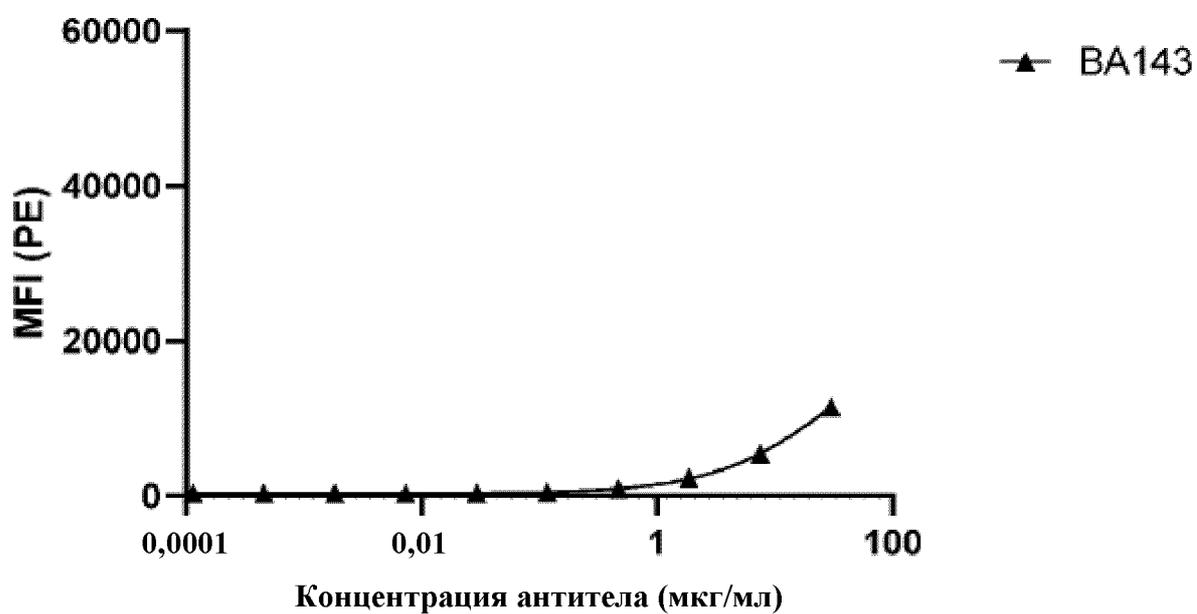
51/68



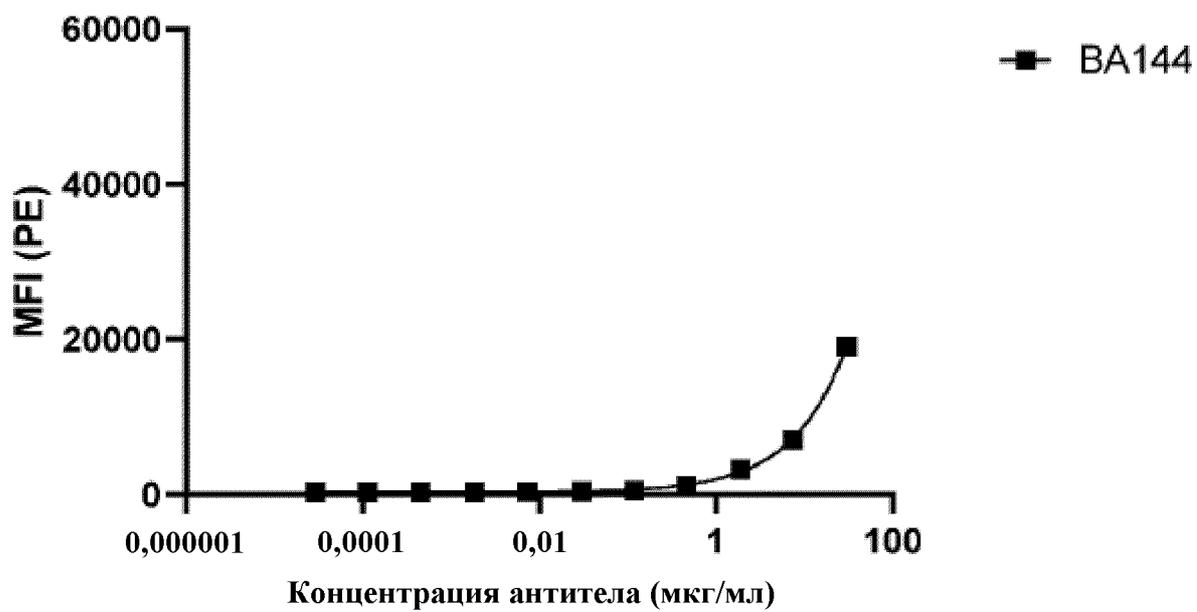
Фиг. 24С



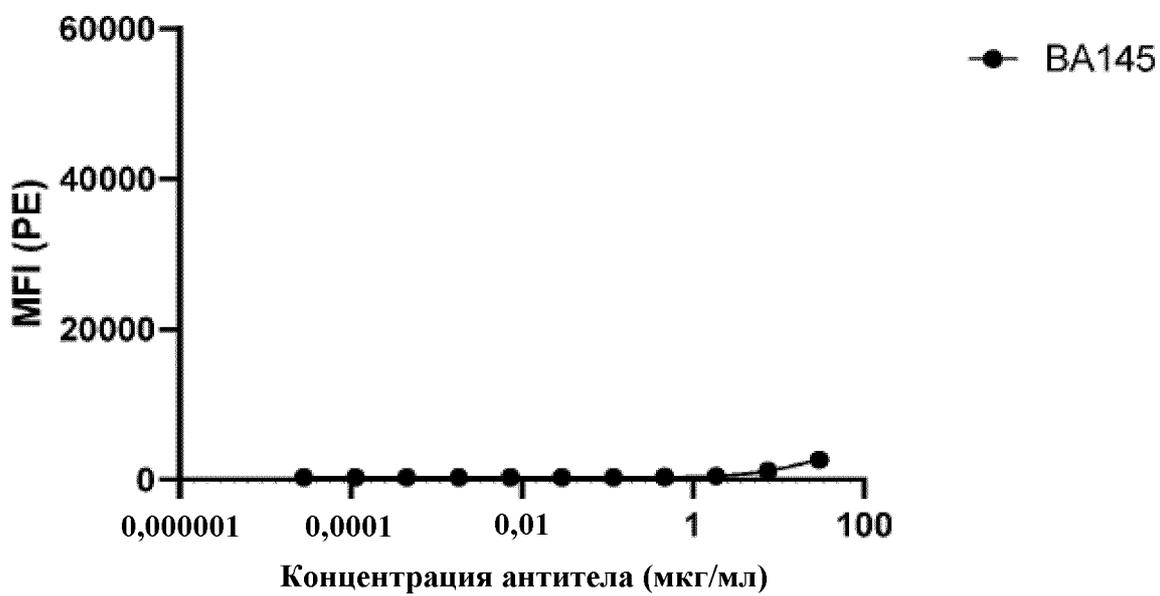
Фиг. 24D



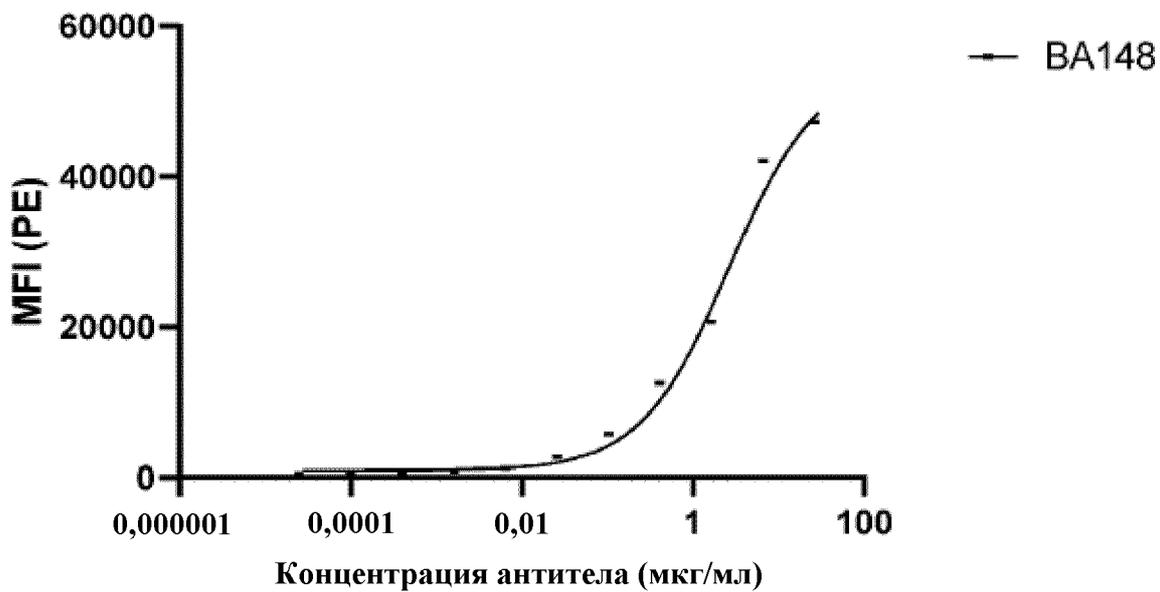
Фиг. 25А



Фиг. 25В



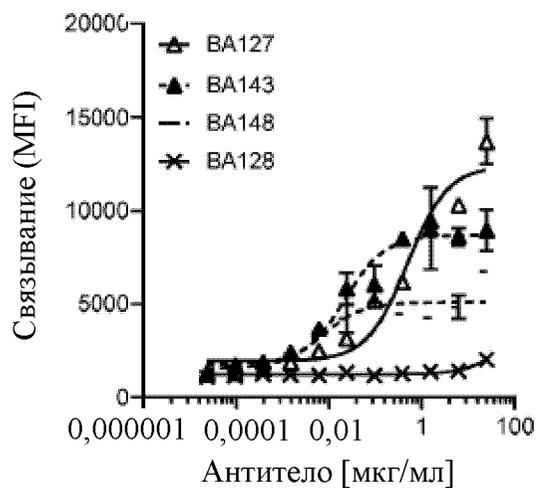
Фиг. 25C



Фиг. 25D

Донор 1

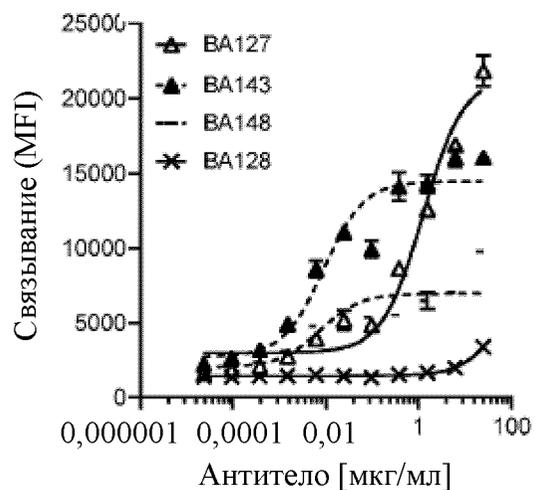
CD4⁺ Т-клетки
(CD3-стимулированные; день 4)



Фиг. 26А

Донор 2

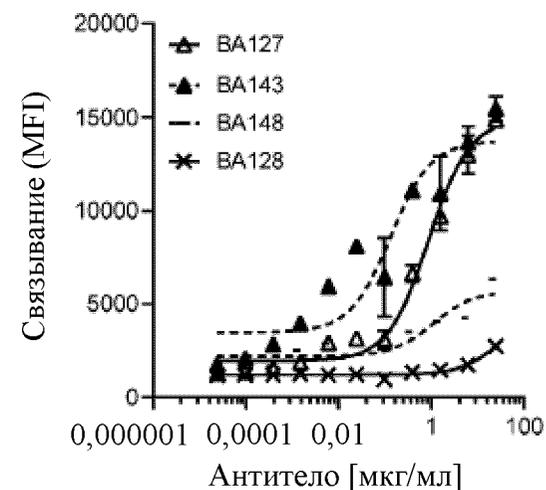
CD4⁺ Т-клетки
(CD3-стимулированные; день 4)



Фиг. 26В

Донор 3

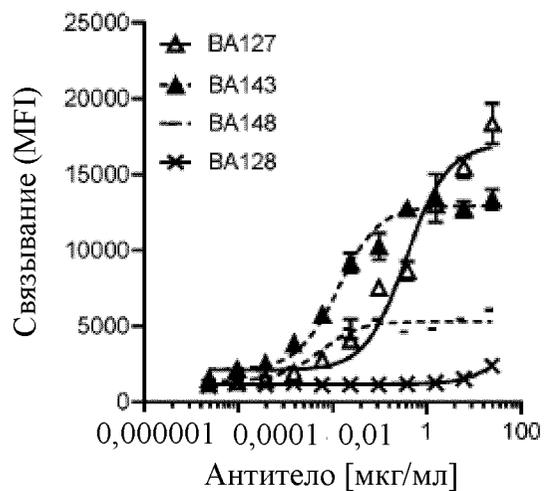
CD4⁺ Т-клетки
(CD3-стимулированные; день 4)



Фиг. 26С

Донор 1

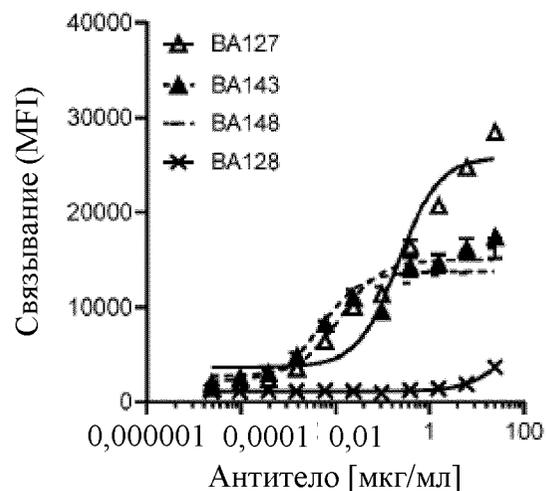
CD8⁺ Т-клетки
(CD3-стимулированные; день 4)



Фиг. 26D

Донор 2

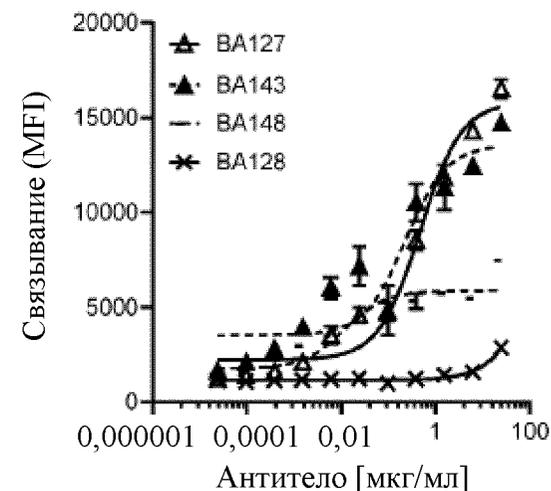
CD8⁺ Т-клетки
(CD3-стимулированные; день 4)



Фиг. 26E

Донор 3

CD8⁺ Т-клетки
(CD3-стимулированные; день 4)

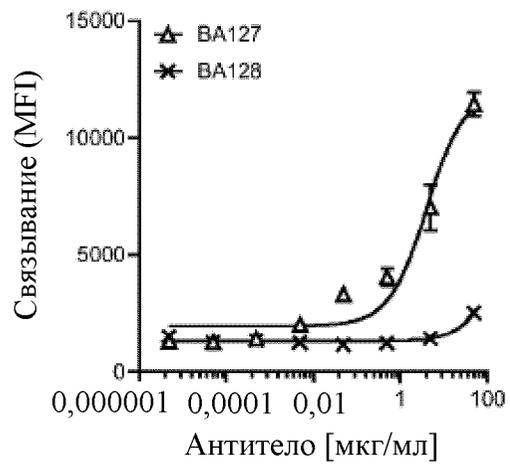


Фиг. 26F

Донор 1

CD4⁺ Т-клетки

(CD3-стимулированные; день 4)

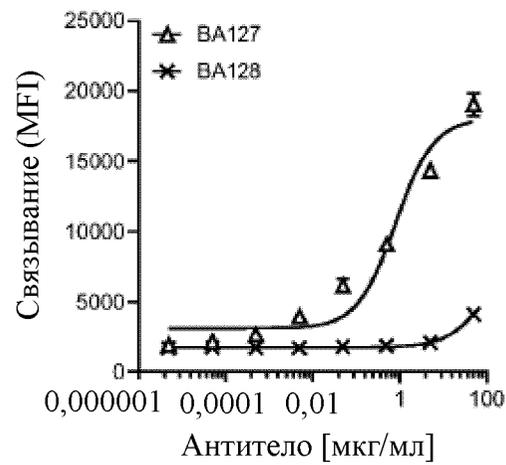


Фиг. 27А

Донор 2

CD4⁺ Т-клетки

(CD3-стимулированные; день 4)

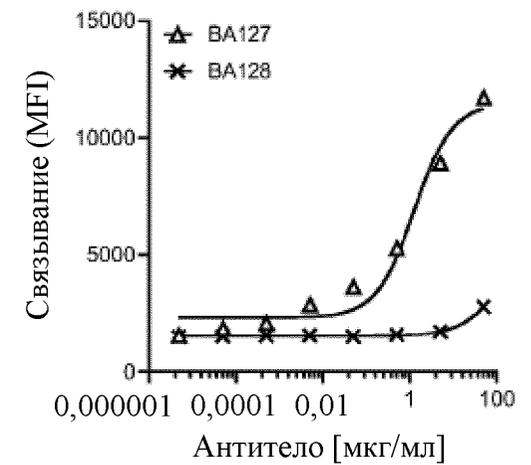


Фиг. 27В

Донор 3

CD4⁺ Т-клетки

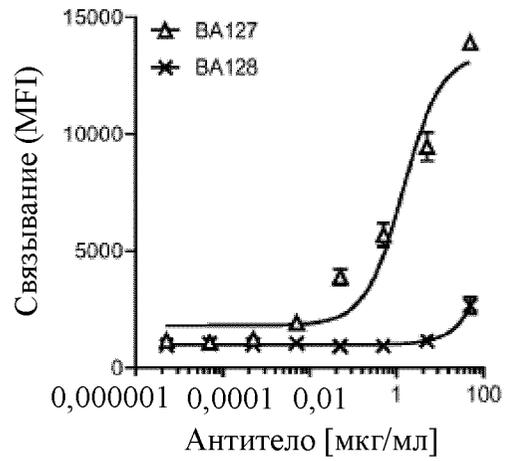
(CD3-стимулированные; день 4)



Фиг. 27С

Донор 1

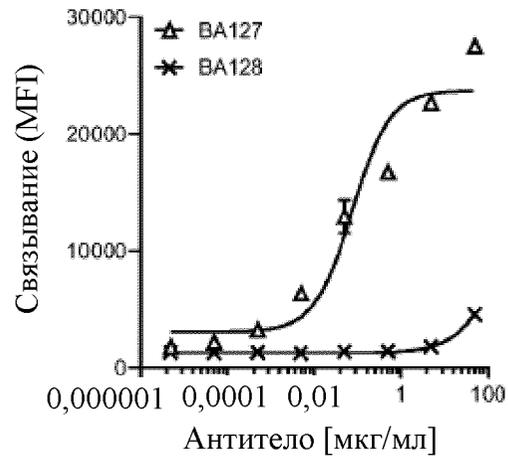
CD8⁺ Т-клетки
(CD3-стимулированные; день 4)



Фиг. 27D

Донор 2

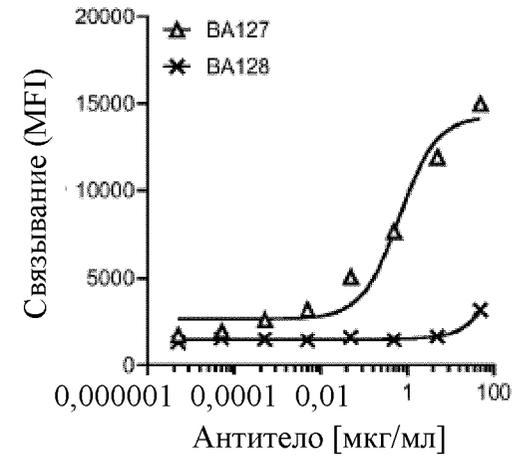
CD8⁺ Т-клетки
(CD3-стимулированные; день 4)



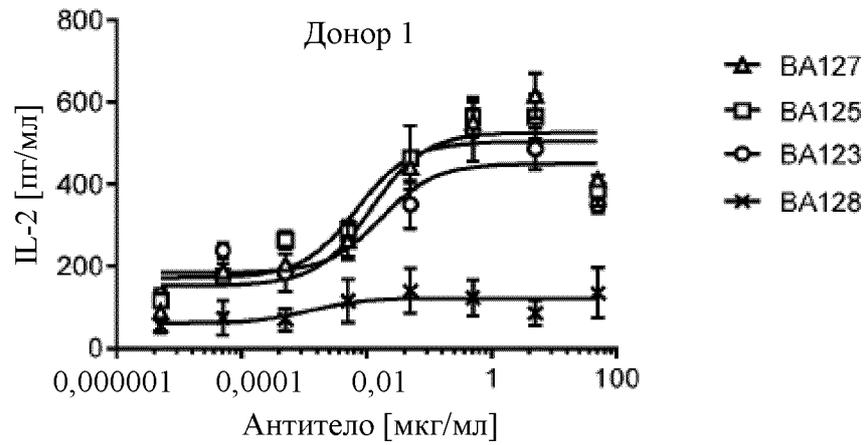
Фиг. 27E

Донор 3

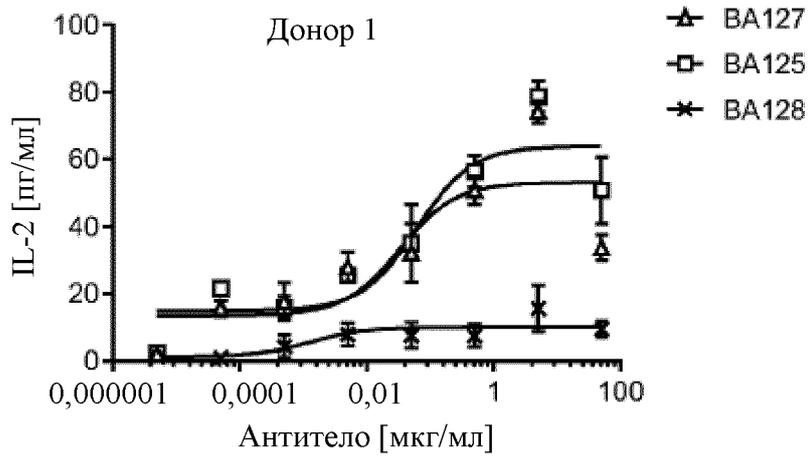
CD8⁺ Т-клетки
(CD3-стимулированные; день 4)



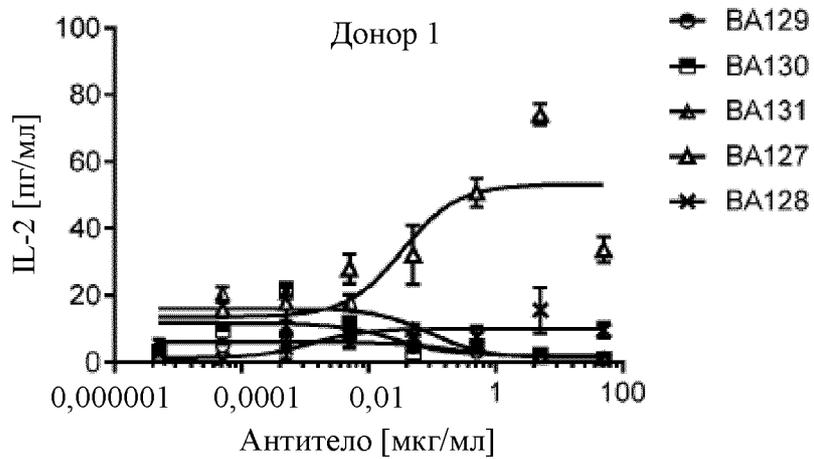
Фиг. 27F



Фиг. 28А

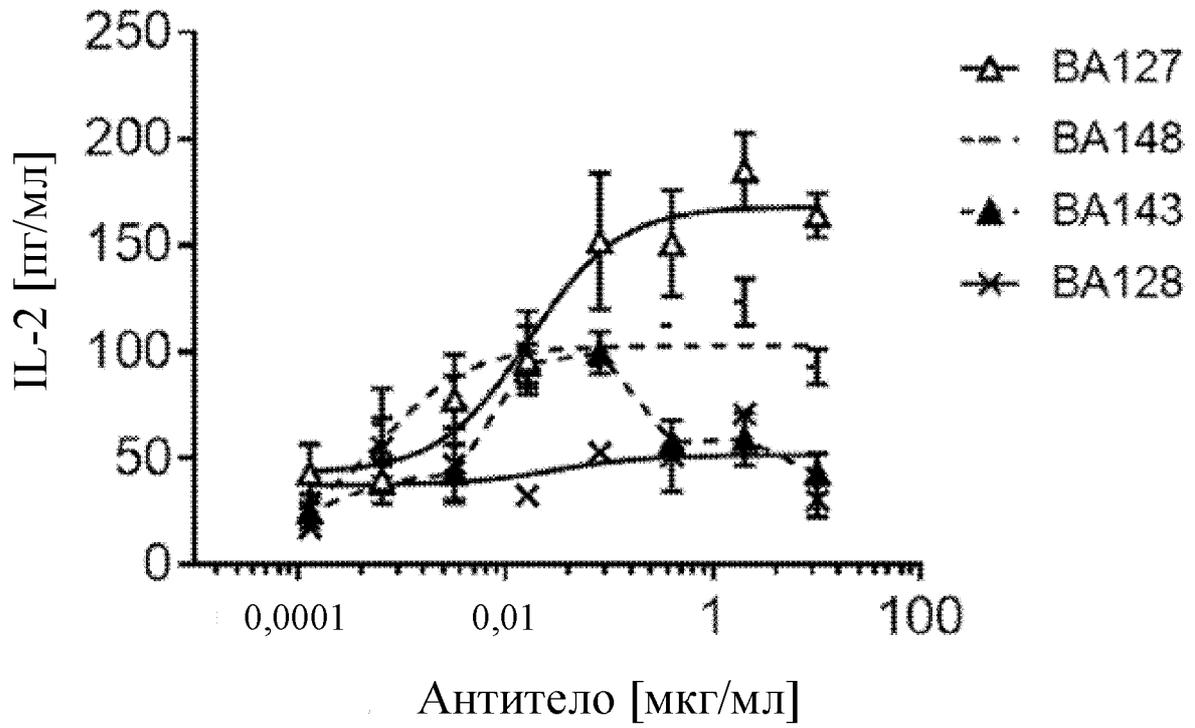


Фиг. 28В

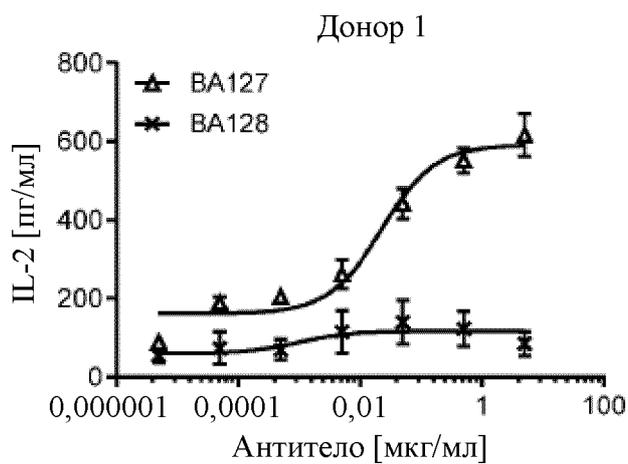


Фиг. 28С

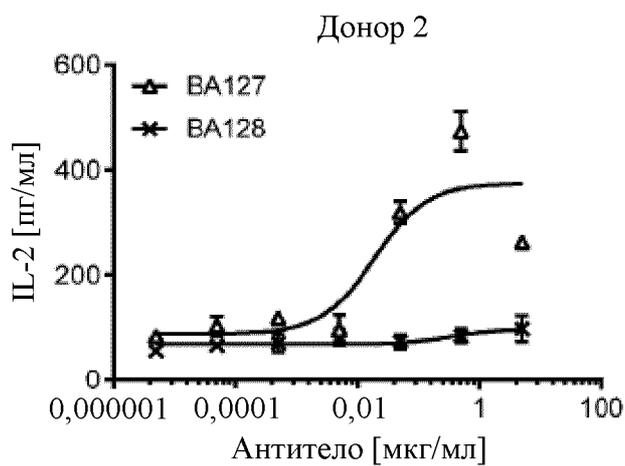
Донор 1



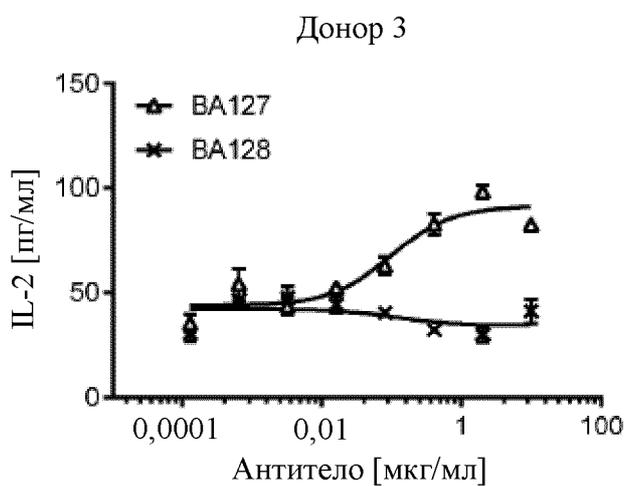
Фиг. 29



Фиг. 30А



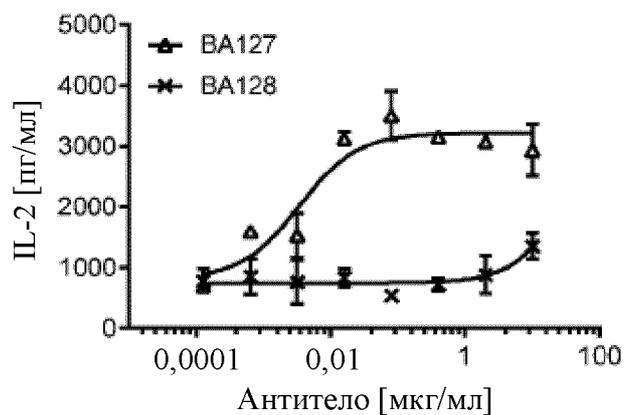
Фиг. 30В



Фиг. 30С

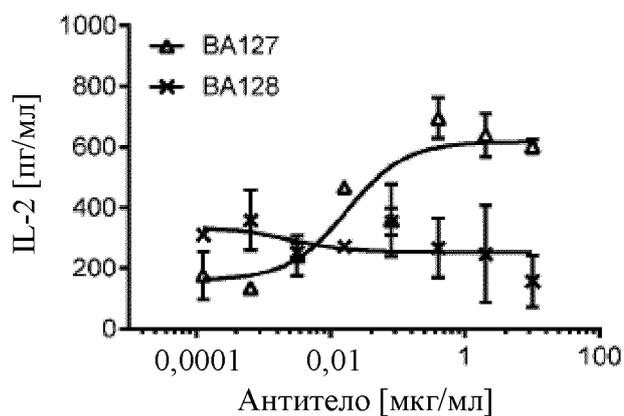
61/68

Донор 4



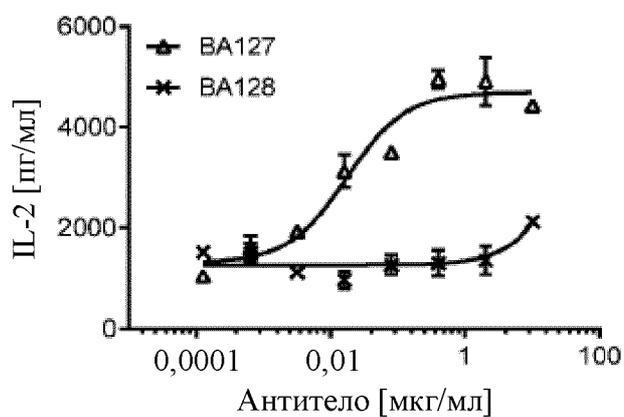
Фиг. 30D

Донор 5

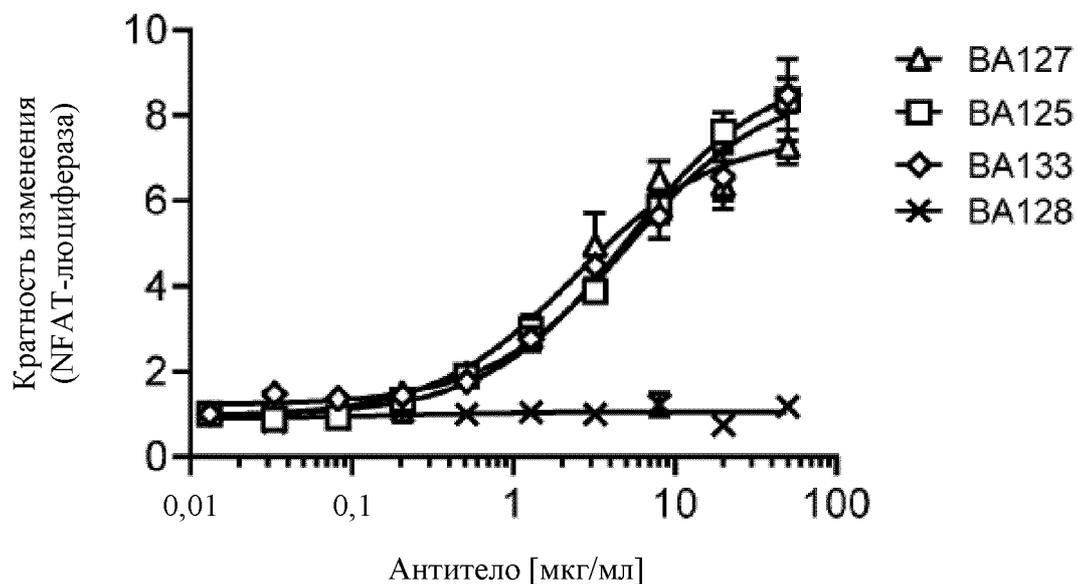


Фиг. 30E

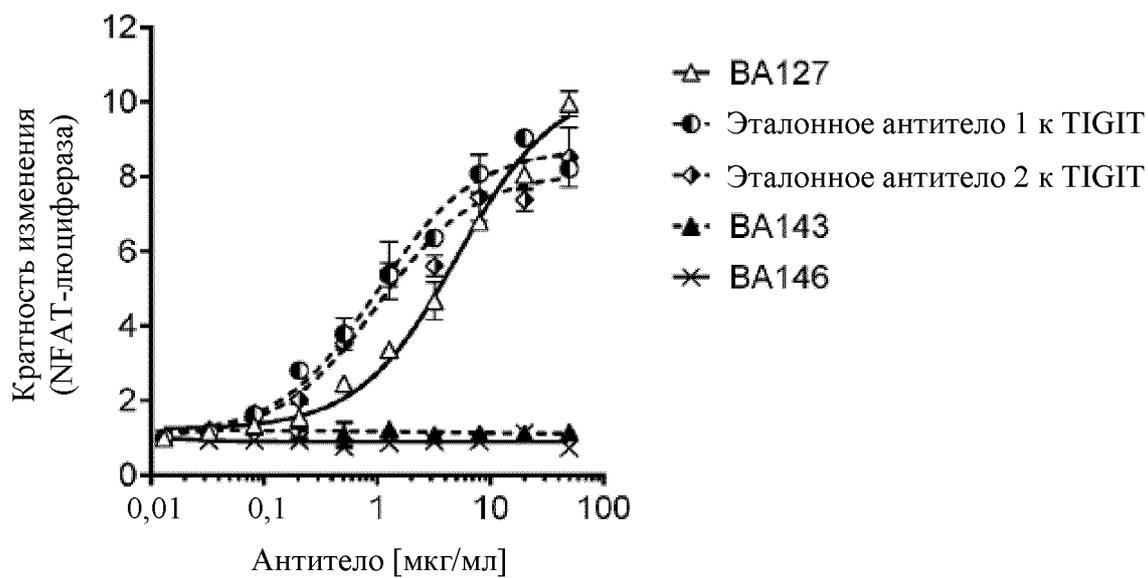
Донор 6



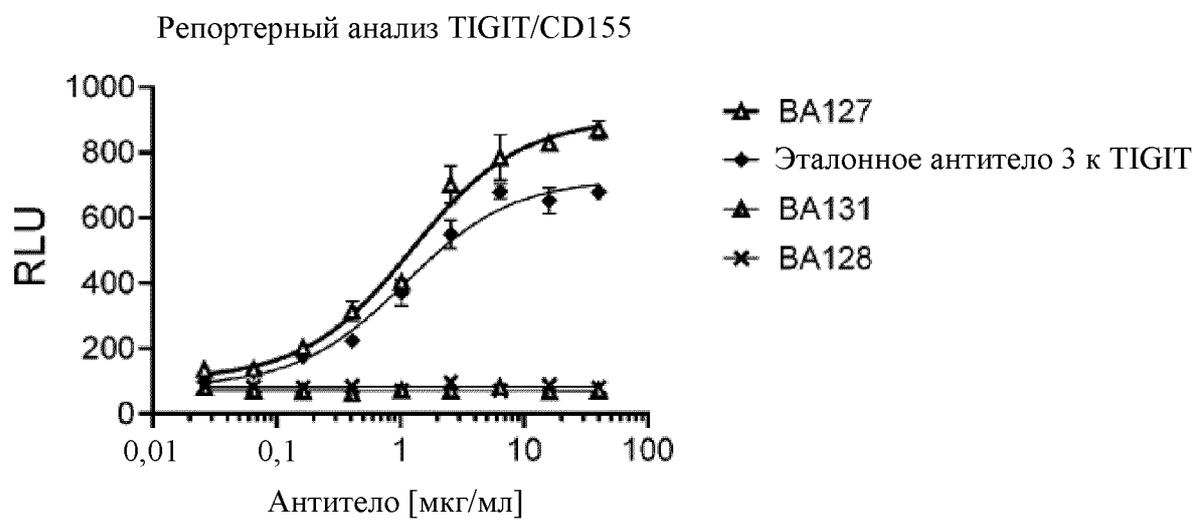
Фиг. 30F



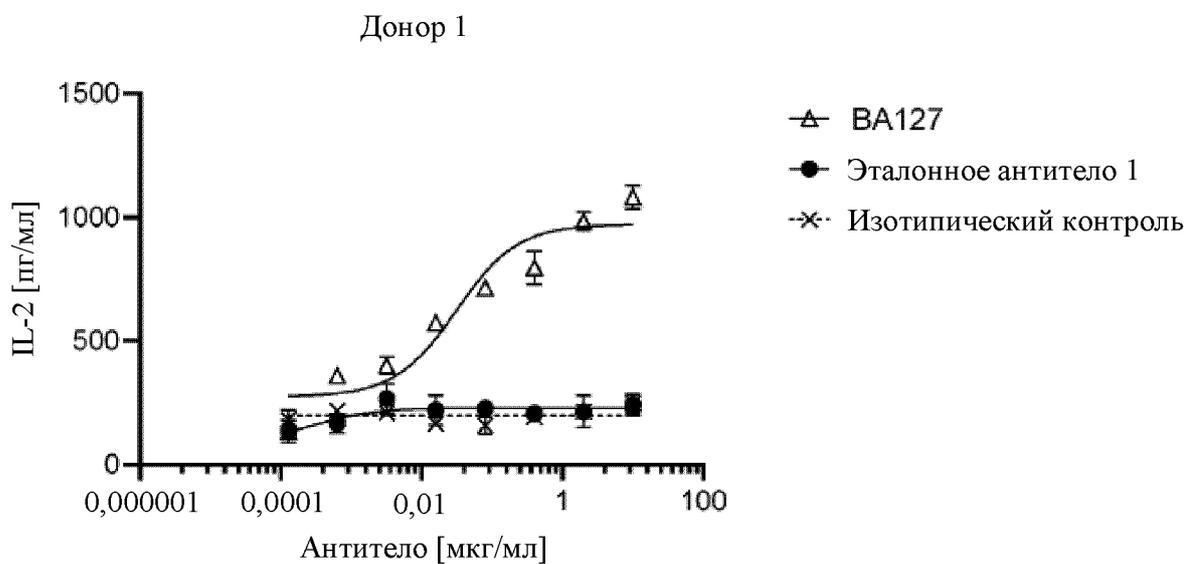
Фиг. 31А



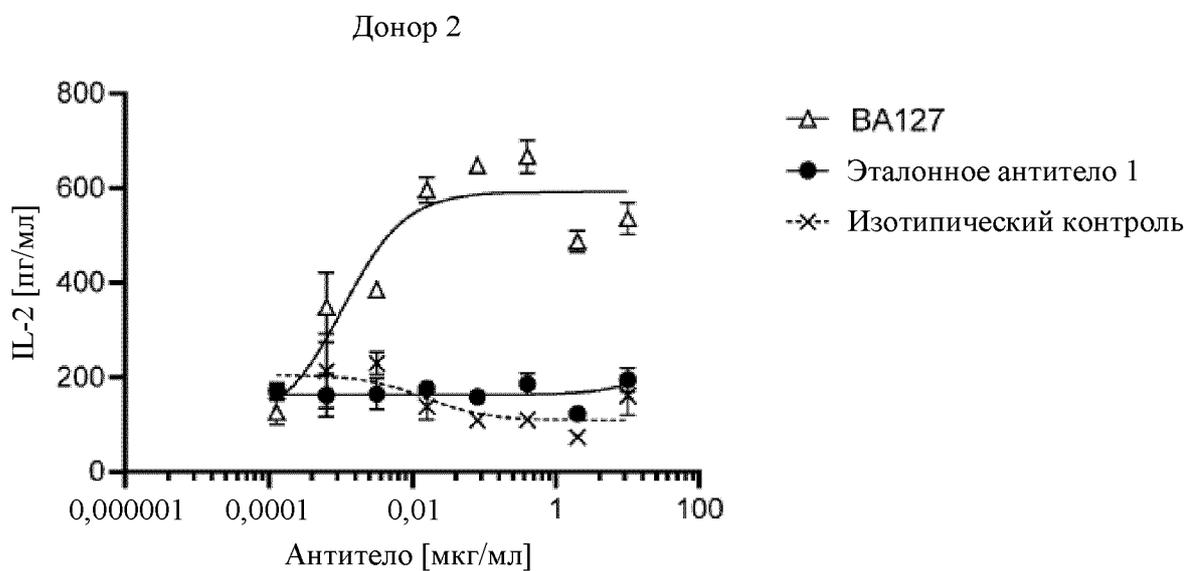
Фиг. 31В



Фиг. 31С

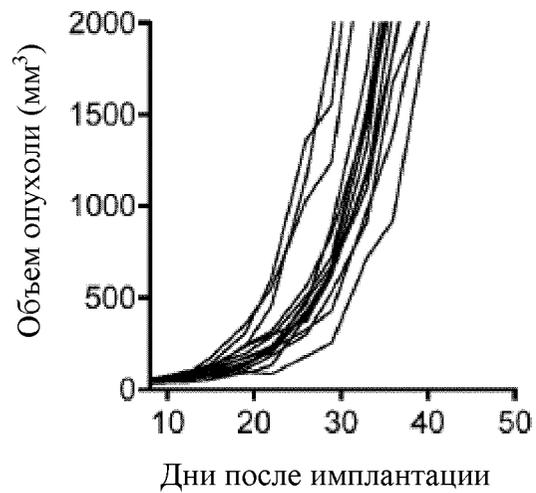


Фиг. 32А



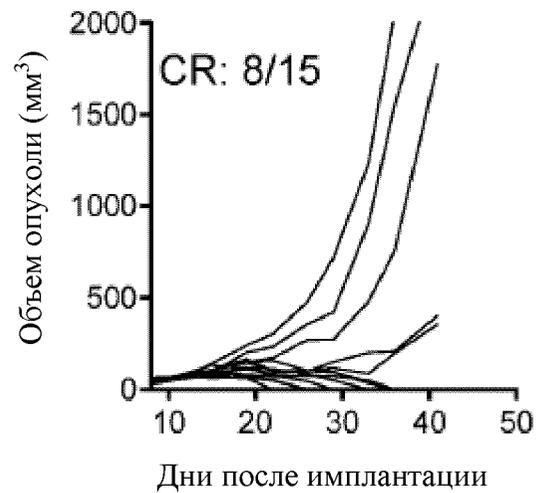
Фиг. 32В

Изотипический контроль
(биспецифический)



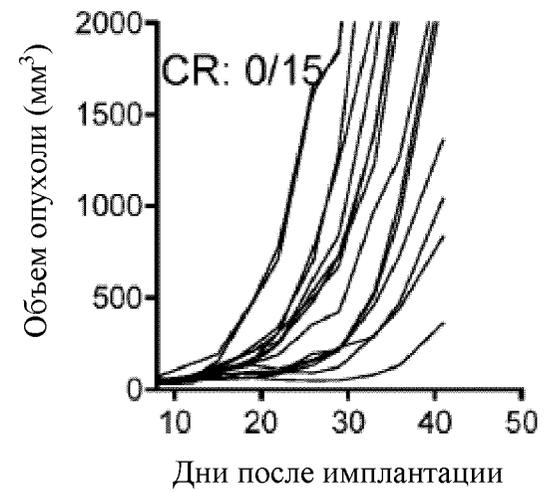
Фиг. 33А

Антитело к TIGIT
(mAb)

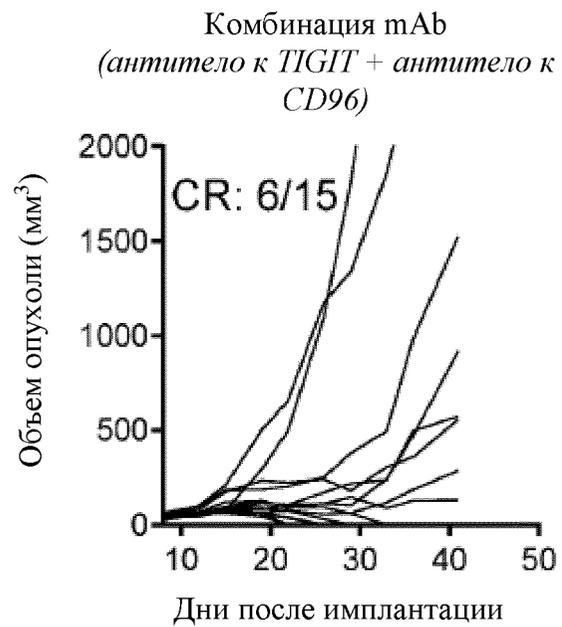


Фиг. 33В

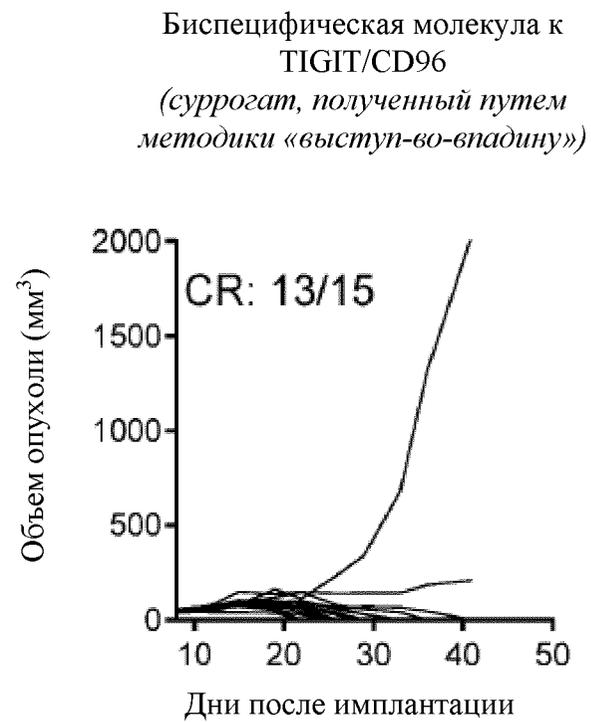
Антитело к CD96
(mAb)



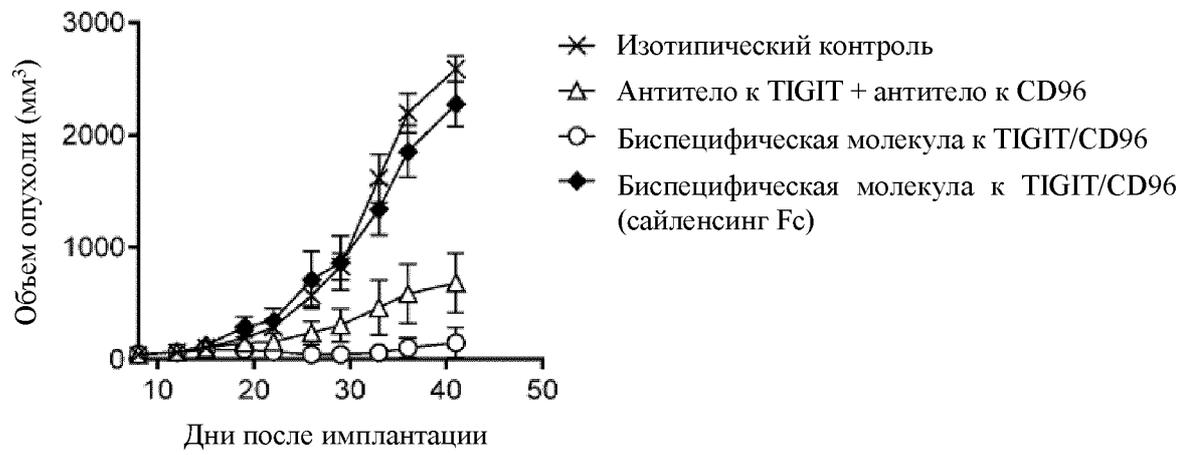
Фиг. 33С



Фиг. 33D

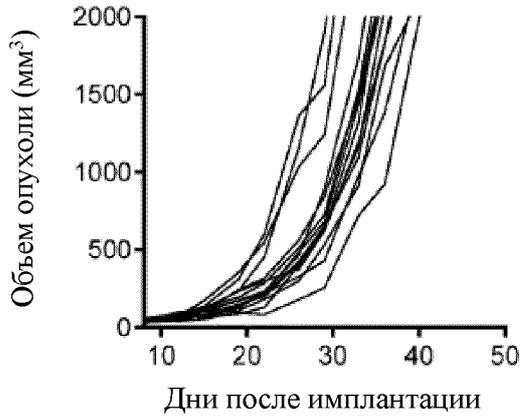


Фиг. 33E



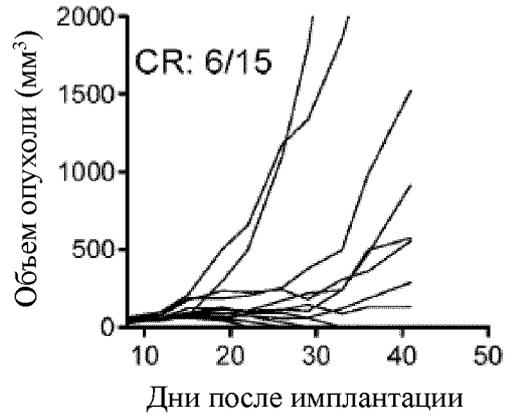
Фиг. 34А

Изотипический контроль
(биспецифический)



Фиг. 34В

Комбинация
моноспецифических антител
(антитело к TIGIT +
антитело к CD96)



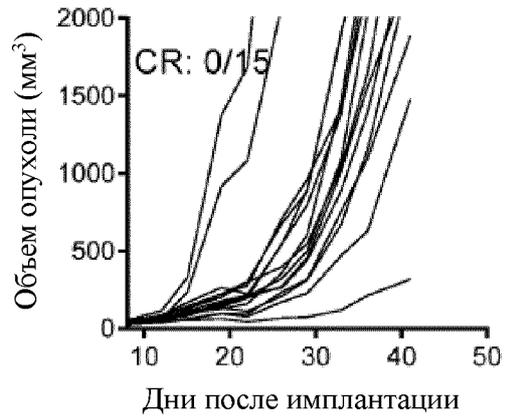
Фиг. 34С

Биспецифическая молекула к
TIGIT/CD96
(суррогат, полученный путем
методики «выступ-во-
впадину»)



Фиг. 34D

Биспецифическая молекула к
TIGIT/CD96
(«выступ-во-впадину»,
сайленсинг Fc)



Фиг. 34Е