

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202490302** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.03.27

(51) Int. Cl. *C07K 16/46* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.07.22

(54) **ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ И ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) 202110842497.1

(72) Изобретатель:

(32) 2021.07.23

**Ван Чжунминь, Ли Байюн, Ся Юй
(CN)**

(33) CN

(86) PCT/CN2022/107522

(74) Представитель:

(87) WO 2023/001303 2023.01.26

Медведев В.Н. (RU)

(71) Заявитель:

**АКЕСО БАЙОФАРМА, ИНК; АКЕСО
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (CN)**

(57) Фармацевтическая композиция, содержащая антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент и биспецифическое антитело против CTLA4/против PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент. В частности, переменная область тяжелой цепи антитела содержит HCDR1-HCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3-5, соответственно, и переменная область легкой цепи содержит LCDR1-LCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8-10, соответственно.

A1

202490302

202490302

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-580150EA/019

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ И ПРИМЕНЕНИЕ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к области фармацевтических средств, в частности, к фармацевтической композиции, которая содержит антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент и биспецифическое антитело против CTLA4/против PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

TIGIT (домен Т-клеточного Ig и ITIM, также известный как WUCAM, Vstm3 или VSIG9) является членом семейства рецепторов полиовируса (PVR)/нектин. TIGIT состоит из внеклеточного домена варибельной области иммуноглобулина (IgV), трансмембранного домена типа I и внутриклеточного домена с классическим иммунорецепторным ингибирующим мотивом на основе тирозина (ITIM) и мотивом на основе тирозина хвоста иммуноглобулина (ITT). TIGIT высоко экспрессируется в лимфоцитах, особенно в эффекторных и регуляторных CD4⁺ Т-клетках, фолликулярных хелперных CD4⁺ Т-клетках и эффекторных CD8⁺ Т-клетках, а также в клетках-натуральных киллерах (NK) (Yu X, Harden K, Gonzalez L C et al. The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells [J]. Nature immunology, 2009, 10(1): 48).

CD155 (также известный как PVR, Necl5 или Tage4), CD112 (также известный как PVRL2/нектин 2) и CD113 (также известный как PVRL3) являются лигандами, с которыми связывается TIGIT (Martinet L, Smyth M J. Balancing natural killer cell activation through paired receptors[J]. Nature Reviews Immunology, 2015, 15(4): 243-254), а CD155 представляет собой высокоаффинный лиганд для TIGIT. В NK-клетках связывание TIGIT с лигандами CD155 и CD112 может ингибировать эффект уничтожения у NK-клеток в отношении клеток с высокой экспрессией TIGIT (Stanietsky N, Simic H, Arapovic J, et al. The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009, 106(42): 17858-17863). Сообщалось, что эффект уничтожения у CD8⁺ Т-клеток может быть усилен при одновременной блокировке PD-1 и TIGIT (Johnston RJ, Comps-Agrar L, Hackney J, et al. The immunoreceptor TIGIT regulates antitumor and antiviral CD8⁺ T cell effector function[J]. Cancer cell, 2014, 26(6): 923-937). В недавних исследованиях было обнаружено, что TIGIT является иммунной контрольной точкой NK-клеток и способен вызывать истощение NK-клеток в качестве ингибирующего рецептора в процессе прогрессирования опухоли; также было продемонстрировано, что моноклональные антитела против TIGIT могут обратить вспять истощение NK-клеток и использоваться в качестве иммунотерапии при различных опухолях (Zhang Q, Bi J, Zheng X, et al., Blockade of the checkpoint receptor TIGIT prevents NK cell exhaustion and elicits potent anti-tumor immunity[J]. Nature immunology, 2018, 19(7): 723-732).

Кроме того, сообщалось, что блокаторы TIGIT индивидуально или в комбинации с блокаторами PD-1 и блокаторами CD96 могут значительно снизить рост меланомы B16 на моделях мышей дикого типа и CD155^{-/-} (Li X-Y, Das I, Lepletier A, et al., CD155 loss enhances tumor suppression via combined host and tumor-intrinsic mechanisms. *J Clin Invest*, 2018, 128:2613-25). Блокаторы CD112R отдельно или в комбинации с блокаторами TIGIT и/или блокаторами PD-1 могут увеличивать способность ТП продуцировать цитокины при раке яичников, раке эндометрия и опухолях легких (Whelan S, Ophir E, Kotturi MF, et al., PVRIG and PVRL2 Are Induced in Cancer and Inhibit CD8⁺ T-cell function. *Cancer Immunol Res*, 2019, 7:257-68).

Лекарственные средства на основе антител против TIGIT, в качестве новых лекарственных средства на основе антител против иммунных контрольных точек, имеют многообещающее применение в различных областях и могут использоваться для иммунотерапии опухолей. Тираголумаб, разработанный компанией «Roche», в настоящее время находится на третьей фазе клинических испытаний, и сообщалось, что комбинация моноклонального антитела против TIGIT Тираголумаба и препарата PD-L1 Tecentriq (атезолизумаб) в качестве терапии первой линии хорошо переносилась пациентами с PD-L1-положительным метастатическим немелкоклеточным раком легких (NSCLC) в клинических исследованиях фазы 2 и оказали значительный эффект - снижение риска прогрессирования заболевания на 43% (Exit C. Roche представит первые клинические данные о новой противоопухолевой анти-TIGIT-иммунотерапии с использованием тираголумаба в ASCO[J]). Существующие клинические данные показывают, что TIGIT является важной мишенью для лечения немелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, рака молочной железы, рака яичников, колоректального рака, меланомы, рака поджелудочной железы, опухоли шейки матки, множественной миеломы, неходжкинской лимфомы, В-лимфомы и плазмноклеточного рака.

Трансмембранный рецептор PD-1 (белок 1 запрограммированной клеточной смерти) является членом семейства CD28 и экспрессируется в активированных Т-клетках, В-клетках и миелоидных клетках. Лиганды PD-1, как PDL1 (лиганд 1 белка 1 запрограммированной клеточной смерти, или PDL-1), так и PDL2 (лиганд 2 белка 1 запрограммированной клеточной смерти, или PDL-2), являются членами суперсемейства B7. PDL1 экспрессируется во множестве клеток, включая Т-клетки, В-клетки, эндотелиальные клетки и эпителиальные клетки, а PDL2 экспрессируется только в антигенпрезентирующих клетках, таких как дендритные клетки и макрофаги.

Сигнальный путь PD-1/PDL1 играет важную роль в регуляции иммунной толерантности, микробной инфекции и ускользании опухоли от иммунитета. PD-1 в основном экспрессируется в иммунных клетках, таких как Т-клетки, а лиганд PDL1 для PD-1 в высокой степени экспрессируется во множестве опухолевых тканей человека. Блокирование сигнального пути PD-1/PDL1 может активировать ингибированные Т-клетки, которые, таким образом, атакуют опухолевые клетки. Блокирование передачи сигналов PD-1/PDL1 может способствовать пролиферации Т-клеток, специфичных для

опухолевого антигена, активировать процесс уничтожения опухолевых клеток и дополнительно ингибировать локальный рост опухоли (Julie R et al., 2012, N Engl J Med., 366: 2455-2465). Кроме того, опухоли с высокой экспрессией PDL1 связаны с злокачественными новообразованиями, которые трудно детектировать (Hamanishi et al., 2007, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104:3360-5). Эффективным методом является введение антитела против PD-1 для модуляции экспрессии PD-1. Благодаря широким противоопухолевым перспективам и удивительной эффективности антител против PD-1 в отрасли широко признано, что антитела, нацеленные на путь PD-1, приведут к прорывам в лечении различных опухолей, например, немелкоклеточного рака легких, почечно-клеточной карциномы, рака яичников и меланомы (Homet M.B., Parisi G., et al., 2015, Semin Oncol., 42(3):466-473), лейкоза и анемии (Held SA, Heine A, et al., 42(3):466-473). al., 2013, Curr Cancer Drug Targets., 13(7):768-74).

Молекулы антигена 4, ассоциированного с цитотоксическими Т-лимфоцитами (CTLA4), и CD28 очень похожи в аспектах структуры генов, хромосомной локализации, гомологии последовательностей и экспрессии генов. Обе молекулы являются рецепторами костимулирующей молекулы B7 и в основном экспрессируются на поверхности активированных Т-клеток. Связывание CTLA4 с B7 ингибирует активацию Т-клеток мыши и человека и играет отрицательную регулируемую роль в активации Т-клеток.

Антитела CTLA4 (или моноклональные антитела против CTLA4) или лиганды CTLA4 могут препятствовать связыванию CTLA4 с его естественными лигандами, тем самым блокируя передачу отрицательных регуляторных сигналов CTLA4 к Т-клеткам и повышая реактивность Т-клеток к различным антигенам. В этом отношении исследования *in vivo* и *in vitro* по существу согласуются. В настоящее время моноклональные антитела CTLA4 проходят клинические испытания или одобрены для лечения рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, колоректального рака, рака желудочно-кишечного тракта, рака печени, злокачественной меланомы и т. д. (Grosso JF., Jure-Kunkel MN., 2013, Cancer Immun., 13:5).

Интерлейкин 2 (IL-2) вырабатывается Т-клетками. Это фактор роста, который регулирует подгруппы Т-клеток и важный фактор регуляции иммунных ответов. Он способствует пролиферации активированных В-клеток и участвует в иммунном ответе, гемопоэзе и надзоре за опухолями. Рекомбинантный человеческий IL-2 одобрен FDA США для лечения злокачественных опухолей, включая меланому, опухоли почек и т. д., в то время как в настоящее время продолжаются клинические исследования по лечению хронических вирусных инфекций (Chavez, A.R., et al., 2009, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1182:с.14-27). CTLA4 и антитела против CTLA4 являются важными факторами, влияющими на функции Т-клеток, и вмешиваются в иммунное микроокружение в организме. Исследования *in vitro* и *in vivo* продемонстрировали, что антитела против CTLA4 могут специфически ослаблять иммуносупрессию CTLA4, активировать Т-клетки и индуцировать образование IL-2 и перспективны для широкого применения в генной терапии таких заболеваний, как опухоли и паразитарные инфекции.

Таким образом, разработка средства лечения или комбинированной схемы введения с более низкой токсичностью и более высокой эффективностью имеет большое значение с клинической точки зрения.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

После интенсивных исследований и творческих усилий авторы изобретения использовали системы экспрессии клеток млекопитающих для экспрессии рекомбинантного человеческого TIGIT в качестве антигена для иммунизации мышей и получил гибридомные клетки путем слияния клеток селезенки мыши и клеток миеломы. Авторы изобретения получили гибридную клеточную линию LT019 (с номером доступа ССТСС NO: С2020208) путем скрининга большого количества образцов.

Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что гибридная клеточная линия LT019 может секретировать специфическое моноклональное антитело (обозначенное 26B12), специфически связывающееся с TIGIT человека, и моноклональное антитело может эффективно связываться с TIGIT, снижать ингибирующее действие TIGIT на иммунные клетки, стимулировать активность Т-клетки, обращать вспять истощение НК-клеток и усиливать эффект иммунных клеток по уничтожению в отношении опухоли. Кроме того, авторы изобретения творчески подготовили гуманизированные антитела против TIGIT человека (обозначенные 26B12H1L1, 26B12H4L1, 26B12H2L2, 26B12H3L2, 26B12H2L3, 26B12H3L3, 26B12H1L4 и 26B12H4L4).

Авторы изобретения также неожиданно обнаружили, что антитела 26B12H1L1, 26B12H4L1, 26B12H2L2, 26B12H3L2, 26B12H2L3, 26B12H3L3, 26B12H1L4 и 26B12H4L4 по настоящему изобретению обладают активностью связывания с TIGIT и обладают сильной аффинностью; 26B12H1L1, 26B12H4L1, 26B12H2L2, 26B12H3L2, 26B12H2L3, 26B12H3L3, 26B12H1L4 и 26B12H4L4 могут эффективно снижать активность TIGIT.

Настоящее изобретение подробно описано ниже.

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

антитело против TIGIT содержит HCDR1-HCDR3, содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 1, и LCDR1-LCDR3, содержащиеся в вариабельной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 6;

предпочтительно, согласно системе нумерации IMGT, антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую HCDR1-HCDR3, имеющие аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 3-5, соответственно, и вариабельную область легкой цепи, содержащую LCDR1-LCDR3, имеющие аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 8-10, соответственно.

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения для антитела против TIGIT или его антигенсвязывающего фрагмента аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела выбрана из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 17; и

аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи антитела выбрана из SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 25.

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения для антитела против TIGIT или его антигенсвязывающего фрагмента,

вариабельная область тяжелой цепи антитела имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, а вариабельная область легкой цепи антитела имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6;

вариабельная область тяжелой цепи антитела имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, а вариабельная область легкой цепи антитела имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19;

вариабельная область тяжелой цепи антитела имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17, а вариабельная область легкой цепи антитела имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19;

вариабельная область тяжелой цепи антитела имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, а вариабельная область легкой цепи антитела имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21;

вариабельная область тяжелой цепи антитела имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, а вариабельная область легкой цепи антитела имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23;

вариабельная область тяжелой цепи антитела имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15, а вариабельная область легкой цепи антитела имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21;

вариабельная область тяжелой цепи антитела имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15, а вариабельная область легкой цепи антитела имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23;

вариабельная область тяжелой цепи антитела имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, а вариабельная область легкой цепи антитела имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25; или

вариабельная область тяжелой цепи антитела имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17, а вариабельная область легкой цепи антитела имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25.

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения для антитела против TIGIT или его антигенсвязывающего фрагмента антитело содержит область, не являющуюся CDR, полученную из вида, отличного от мыши, например, из человеческого антитела.

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения для антитела против TIGIT или его антигенсвязывающего фрагмента антитело содержит константную область тяжелой цепи, которая представляет собой С-область гамма-1-цепи Ig (например, № NCBI: P01857) и константную область легкой цепи, которая представляет собой С-область каппа-цепи Ig (например, № NCBI: P01834).

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения для антитела против TIGIT или его антигенсвязывающего фрагмента антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент выбрано из Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb, фрагмента области, определяющий комплементарность, одноцепочечного антитела, гуманизированного антитела, химерного антитела или диантитела.

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с TIGIT-mFc с KD менее 4E-10 или менее 4E-11; предпочтительно KD измеряют прибором молекулярного взаимодействия Fortebio.

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент антитело связывается с TIGIT-mFc с EC₅₀ менее 1,5 нМ, менее 1,2 нМ или менее 1 нМ; предпочтительно EC₅₀ измеряют с помощью проточного цитометра.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело против TIGIT представляет собой моноклональное антитело.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело против TIGIT представляет собой гуманизированное антитело, химерное антитело или полиспецифическое антитело (например, биспецифическое антитело).

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

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения для антитела против TIGIT или его антигенсвязывающего фрагмента антитело представляет собой антитело, продуцируемое гибридомной клеточной линией LT019, депонированное в Китайском центре коллекции типовых культур (ССТСС) с номером доступа ССТСС №: C2020208.

Другой аспект настоящего изобретения относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому аспекту настоящего изобретения.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к вектору, содержащему

выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению.

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

Еще один аспект настоящего изобретения относится к гибридной клеточной линии LT019, депонированной в Китайском центре коллекций типовых культур (ССТСС) под номером доступа ССТСС NO: C2020208.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к конъюгату, содержащему антитело и конъюгированный фрагмент, где антитело представляет собой антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому аспекту настоящего изобретения, а конъюгированный фрагмент представляет собой детектируемую метку; предпочтительно, конъюгированный фрагмент представляет собой радиоизотоп, флуоресцентное вещество, люминесцентное вещество, окрашенное вещество или фермент.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к набору, содержащему антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому аспекту настоящего изобретения или содержащему конъюгат по настоящему изобретению;

причем предпочтительно, набор дополнительно содержит вторичное антитело, специфически распознающее данное антитело; необязательно, вторичное антитело дополнительно содержит детектируемую метку, например, радиоизотоп, флуоресцентное вещество, люминесцентное вещество, окрашенное вещество или фермент.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к использованию антитела согласно любому аспекту настоящего изобретения или конъюгата по настоящему изобретению при приготовлении набора для детектирования присутствия или уровня TIGIT в образце.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому аспекту настоящего изобретения или конъюгат по настоящему изобретению; необязательно, фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель и/или вспомогательное вещество.

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция дополнительно содержит одно или более антител против PD-1 или одно или более антител против PD-L1, например, биспецифическое антитело против CTLA4/против PD-1.

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения в фармацевтической композиции антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент и антитело против PD-1 или антитело против PD-L1 присутствуют в массовом соотношении 1:5-5:1 в пересчете на антитела, например, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 или 5:1.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к комбинированному

продукту (например, набору), содержащему первый продукт и второй продукт в отдельных упаковках, где

первый продукт включает антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент согласно любому аспекту настоящего изобретения, конъюгат по настоящему изобретению или фармацевтическую композицию согласно любому аспекту настоящего изобретения;

второй продукт содержит по меньшей мере одно антитело против PD-1 или по меньшей мере одно антитело против PD-L1, например, биспецифическое антитело против CTLA4/против PD-1;

предпочтительно, комбинированный продукт дополнительно содержит третий продукт в отдельной упаковке, содержащий одно или более химиотерапевтических лекарственных средств;

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

предпочтительно, комбинированный продукт дополнительно содержит листок-вкладыш;

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения для комбинированного продукта антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент и антитело против PD-1 или антитело против PD-L1 присутствуют в массовом соотношении 1:5-5:1 в пересчете на антитела, например, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 или 5:1.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к применению антитела согласно любому аспекту настоящего изобретения, конъюгата по настоящему изобретению, фармацевтической композиции согласно любому аспекту настоящего изобретения или комбинированного продукта согласно любому аспекту настоящего изобретения при получении лекарственного средства для лечения и/или предотвращения опухоли.

Антитело согласно любому аспекту настоящего изобретения, конъюгат по настоящему изобретению, фармацевтическая композиция согласно любому аспекту настоящего изобретения или комбинированный продукт согласно любому аспекту настоящего изобретения предназначены для применения для лечения и/или предотвращения опухоли.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к способу лечения и/или предотвращения опухоли, включающему введение пациенту эффективного количества антитела согласно любому аспекту настоящего изобретения, конъюгата по настоящему изобретению, фармацевтической композиции согласно любому аспекту настоящего изобретения или комбинированного продукта согласно любому аспекту настоящего изобретения.

Настоящее изобретение относится к способу предотвращения и/или лечения опухоли (в частности, злокачественной опухоли) или инфекции или инфекционного

заболевания, включающему введение пациенту терапевтически эффективного количества антитела против TIGIT в комбинации с биспецифическим антителом против CTLA4/против PD-1 и, более предпочтительно, дополнительно в комбинации с одним или более лекарственными средствами (например, химиотерапевтическим агентом или ингибитором роста, терапевтическим агентом направленного действия, конъюгатом антитело-лекарственное средство, антиметаболитом, антибиотиком, противоопухолевым средством растительного происхождения и/или гормональным лекарственным средством, адриамицином, тамоксифеном, мегестролом и/или аспарагиназой), где предпочтительно антитело против TIGIT, биспецифическое антитело против CTLA4/против PD-1 и противоопухолевое химиотерапевтическое лекарственное средство вводят одновременно или последовательно.

В некоторых вариантах осуществления химиотерапевтический агент или ингибитор роста выбран из препарата на основе платины (например, цисплатина, карбоплатина и оксалиплатина), противоопухолевого лекарственного средства на основе фторурацила, циклофосфида, пеметрекседа, паклитаксела, алкалоидов барвинка, адриамицина, гозерелина, алкилирующего агента, антрациклина, антигормонального агента, ингибитора ароматазы, антиандрогенного агента, ингибитора протеинкиназы, ингибитора липидкиназы, антисмыслового олигонуклеотида, рибозима, антиметаболита, ингибитора топоизомеразы, цитотоксического агента или противоопухолевого антибиотика, ингибитора протеасом, антимицротрубочкового агента, антагониста EGFR, ретиноида, ингибитора тирозинкиназы, ингибитора гистондеацетилазы и их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент направленного действия выбран из ингибитора B-raf, ингибитора MEK, ингибитора K-ras, ингибитора c-Met, ингибитора Alk, ингибитора фосфатидилин-озитол-3-киназы, ингибитора Akt, ингибитора mTOR, ингибитора двойного действия фосфатидилинозитол-3-киназы и mTOR и их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство содержит лекарственное средство, выбранное из группы, состоящей из: майтанзина, монометилауристатина E, калихеамицина, эсперамицина и радиоизотопного хелатирующего агента.

Настоящее изобретение относится к способу предотвращения и/или лечения опухоли (в частности, злокачественной опухоли), включающему введение пациенту терапевтически эффективного количества антитела против TIGIT в комбинации с биспецифическим антителом против CTLA4/против PD-1, и, более предпочтительно, дополнительно в комбинации с одним или более химиотерапевтическим лекарственным средством; предпочтительно антитело против TIGIT, биспецифическое антитело против CTLA4/против PD-1 и химиотерапевтическое лекарственное средство вводят одновременно или последовательно.

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения опухоль выбрана из одной или более из следующих: рак поджелудочной железы, рак молочной

железы, рак яичников, колоректальный рак, опухоль шейки матки, множественная миелома, неходжкинская лимфома, В-лимфома, плазмноклеточный рак, рак головы и шеи, рак головного мозга, рак горла, рак носоглотки, рак пищевода, плоскоклеточный рак пищевода, рак щитовидной железы, мезотелиома, аденокарцинома (например, рак поджелудочной железы и рак молочной железы), рак легких (например, немелкоклеточный рак легкого и мелкоклеточный рак легкого), рак молочной железы, рак печени (например, гепатоцеллюлярная карцинома и гепатобилиарный рак), рак желудка, рак желудочно-кишечного тракта, рак кишечника (например, рак толстой кишки и колоректальный рак), рак желчевыводящих путей (например, холангиокарцинома), рак почки, рак фаллопиевой трубы, рак эндометрия, рак шейки матки, рак мочевого пузыря, уротелиальная карцинома, рак предстательной железы, рак яичка, рак кожи, меланома, миелома (например, множественная миелома), неходжкинская лимфома, В-лимфома, плазмноклеточная карцинома, лейкоз, лимфома, рак кости, остеосаркома, хондросаркома, солидные опухоли с высоким уровнем микросателлитной нестабильности (MSI-H) или дефицитом репарации несоответствия (dMMR).

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения биспецифическое антитело против CTLA4/против PD-1 содержит:

первую функциональную область белка, нацеленную на PD-1, и вторую функциональную область белка, нацеленную на CTLA4,

где первая функциональная область белка представляет собой иммуноглобулин, а вторая функциональная область белка представляет собой одноцепочечное антитело, или первая функциональная область белка представляет собой одноцепочечное антитело, а вторая функциональная область белка представляет собой иммуноглобулин,

где

иммуноглобулин содержит HCDR1-HCDR3 (предпочтительно HCDR1-HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 29-31, соответственно) в переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 27, и LCDR1-LCDR3 (предпочтительно LCDR1-LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 32-34, соответственно) в переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 28; одноцепочечное антитело содержит HCDR1-HCDR3 (предпочтительно HCDR1-HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 37-39, соответственно) в переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 35, и LCDR1-LCDR3 (предпочтительно LCDR1-LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 40-42, соответственно) в переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 36;

или

иммуноглобулин содержит HCDR1-HCDR3 (предпочтительно HCDR1-HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 37-39, соответственно) в переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 35, и LCDR1-LCDR3 (предпочтительно LCDR1-LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 40-42, соответственно) в переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 36; одноцепочечное антитело содержит HCDR1-HCDR3 (предпочтительно HCDR1-HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 29-31,

соответственно) в вариабельной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 27, и LCDR1-LCDR3 (предпочтительно LCDR1-LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 32-34, соответственно) в вариабельной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 28.

В конкретном варианте осуществления биспецифического антитела против CTLA4/против PD-1 согласно настоящему изобретению

аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина выбрана из SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 43, или последовательности, имеющей по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% гомологии с ними; аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина выбрана из SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 44, или последовательности, имеющей по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% гомологии с ними; аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи одноцепочечного антитела выбрана из SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 и SEQ ID NO: 48, или последовательности, имеющей по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% гомологии с ними; аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи одноцепочечного антитела выбрана из SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51 и SEQ ID NO: 52, или последовательности, имеющей по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% гомологии с ними;

или

аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина выбрана из SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 и SEQ ID NO: 48, или последовательности имеющие по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% гомологии с ними; аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи иммуноглобулина выбирают из SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51 и SEQ ID NO: 52, или последовательности имеющие по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% гомологии с ними; аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи одноцепочечного антитела выбрана из SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 43, или последовательность, содержащая по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% гомологии с ними; аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи одноцепочечного антитела выбрана из SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 44, или последовательность, содержащая по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% гомологичности с ними.

В конкретном варианте осуществления биспецифического антитела против CTLA4/против PD-1 согласно настоящему изобретению биспецифическое антитело выбрано из любого из следующих (1)-(20):

(1) вариабельная область тяжелой цепи иммуноглобулина имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 27, или последовательность, имеющую по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по

по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% гомологии с ней, и переменная область легкой цепи одноцепочечного антитела имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 44, или последовательность, имеющую по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% гомологии с ними.

В конкретном варианте осуществления биспецифического антитела против CTLA4/против PD-1 согласно настоящему изобретению

тяжелая цепь иммуноглобулина имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 53, или последовательность, имеющую по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% гомологии с ней, и его легкая цепь имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 54 или последовательность, имеющую по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% гомологии с ней.

В конкретном варианте осуществления биспецифического антитела против CTLA4/против PD-1 по настоящему изобретению первая функциональная область белка связана со второй функциональной областью белка либо непосредственно, либо через линкерный фрагмент, и/или переменная область тяжелой цепи одноцепочечного антитела связана с переменной областью легкой цепи одноцепочечного антитела либо непосредственно, либо через линкерный фрагмент.

В конкретном варианте осуществления биспецифического антитела против CTLA4/против PD-1 согласно настоящему изобретению линкерный фрагмент представляет собой (GGGS)_n, где n представляет собой положительное целое число; предпочтительно n равно 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

В конкретном варианте осуществления биспецифического антитела против CTLA4/против PD-1 согласно настоящему изобретению количество первой

функциональной области белка и второй функциональной области белка независимо составляет 1, 2 или более.

В конкретном варианте осуществления биспецифического антитела против CTLA4/против PD-1 по настоящему изобретению одноцепочечное антитело (предпочтительно вариабельная область тяжелой цепи) связано с С-концом тяжелой цепи иммуноглобулина.

В конкретном варианте осуществления биспецифического антитела против CTLA4/против PD-1 согласно настоящему изобретению

иммуноглобулин относится к подтипу IgG1 человека,

где, согласно системе нумерации EU, константная область тяжелой цепи иммуноглобулина имеет одну из комбинаций следующих мутаций:

L234A и L235A; или

L234A и G237A; или

L235A и G237A; или

L234A, L235A и G237A.

В конкретном варианте осуществления биспецифического антитела против CTLA4/против PD-1 согласно настоящему изобретению биспецифическое антитело содержит:

первую функциональную область белка, нацеленную на PD-1, и

вторую функциональную область белка, нацеленную на CTLA4,

количество первой функциональной области белка равно 1, а количество второй функциональной области белка равно 2;

где первая функциональная область белка представляет собой иммуноглобулин, а вторая функциональная область белка представляет собой одноцепочечное антитело;

тяжелая цепь иммуноглобулина имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 53, или последовательность, имеющую по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% гомологии с ней, и его легкая цепь имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 54, или последовательность, имеющую по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% гомологии с ней;

вариабельная область тяжелой цепи одноцепочечного антитела имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 48, или последовательность, имеющую по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% гомологии с ней, и вариабельная область легкой цепи одноцепочечного антитела имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 52, или последовательность, имеющую по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% гомологии с ней;

одноцепочечное антитело связано с С-концом тяжелой цепи иммуноглобулина;

первая функциональная область белка связана со второй функциональной областью белка через первый линкерный фрагмент; вариабельная область тяжелой цепи одноцепочечного антитела связана с вариабельной областью легкой цепи одноцепочечного антитела через второй линкерный фрагмент; первый линкерный фрагмент и второй линкерный фрагмент идентичны или различны;

предпочтительно, каждый из первого линкерного фрагмента и второго линкерного фрагмента имеет аминокислотную последовательность, независимо выбранную из SEQ ID NO: 55 и SEQ ID NO: 56;

предпочтительно, аминокислотные последовательности первого линкерного фрагмента и второго линкерного фрагмента представлены в SEQ ID NO: 56.

В конкретном варианте осуществления тяжелая цепь биспецифического антитела против CTLA4/против PD-1 согласно настоящему изобретению имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 57, легкая цепь имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 59, и это биспецифическое антитело имеет структуру IgG-scFv, где часть IgG представляет собой антитело против PD1, а часть scFv представляет собой антитело против CTLA4,

где последовательность HCDR1 антитела против PD1 представлена в SEQ ID NO: 61, последовательность HCDR2 представлена в SEQ ID NO: 62, последовательность HCDR3 представлена в SEQ ID NO: 63, последовательность VH представлена в SEQ ID NO: 73, последовательность LCDR1 антитела против PD1 представлена в SEQ ID NO: 70, последовательность LCDR2 представлена в SEQ ID NO: 71, последовательность LCDR3 представлена в SEQ ID NO: 72, и последовательность VL представлена в SEQ ID NO: 76;

последовательность HCDR1 антитела против CTLA4 представлена в SEQ ID NO: 64, последовательность HCDR2 представлена в SEQ ID NO: 65, последовательность HCDR3 представлена в SEQ ID NO: 66, последовательность VH представлена в SEQ ID NO: 74, последовательность LCDR1 антитела против CTLA4 представлена в SEQ ID NO: 67, последовательность LCDR2 представлена в SEQ ID NO: 68, последовательность LCDR3 представлена в SEQ ID NO: 69, и последовательность VL представлена в SEQ ID NO: 75;

Другой аспект настоящего изобретения относится к стандартному составу, предпочтительно используемому для лечения опухоли, и содержащему 1-10000 мг (предпочтительно 10-1000 мг, предпочтительно 50-500 мг, 100-400 мг, 150-300 мг, 150-250 мг или 200 мг) антитела против TIGIT согласно любому аспекту настоящего изобретения и 1-10000 мг (предпочтительно 1-1000 мг, предпочтительно 50-500 мг, 100-400 мг, 150-300 мг, 150-250 мг, 200 мг или 100 мг) биспецифического антитела против CTLA4/против PD-1 согласно любому аспекту настоящего изобретения и необязательно одно или более химиотерапевтических лекарственных средств (таких как лекарственное средство на основе платины и/или или противоопухолевое лекарственное средство на основе фторурацила) согласно настоящему изобретению, где антитело против TIGIT, биспецифическое антитело против CTLA4/против PD-1 и химиотерапевтическое лекарственное средство упакованы отдельно.

Настоящее изобретение относится к способу предотвращения или лечения рака, или опухоли, где способ включает введение пациенту одной или более стандартных составов согласно настоящему изобретению; предпочтительно биспецифическое антитело против CTLA4/против PD-1, антитело против TIGIT и химиотерапевтическое лекарственное средство в стандартном составе вводят каждое отдельно.

Другой аспект настоящего изобретения относится к однократной лекарственной форме, предпочтительно используемой для лечения опухоли, и содержащей 0,1-10000 мг (предпочтительно 1-1000 мг, предпочтительно 50-500 мг, 100-400 мг, 150-300 мг, 150-250 мг, 200 мг или 100 мг) антитела против TIGIT согласно любому аспекту настоящего изобретения и 0,1-10000 мг (предпочтительно 1-1000 мг, предпочтительно 50-500 мг, 100-400 мг, 150-300 мг) мг, 150-250 мг, 200 мг или 100 мг) биспецифического антитела против CTLA4/против PD-1 согласно любому аспекту настоящего изобретения.

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения антитело против TIGIT, биспецифическое антитело против CTLA4/против PD-1 и/или химиотерапевтическое лекарственное средство находятся в форме, подходящей для внутривенной инъекции или внутривенной капельной инфузии, предпочтительно в виде жидкой формы.

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения введение пациенту эффективного количества антитела против TIGIT согласно любому аспекту настоящего изобретения и/или биспецифического антитела против CTLA4/против PD-1 согласно любому аспекту настоящего изобретения осуществляют до или после

хирургического лечения и/или до или после лучевой терапии.

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения стандартная доза антитела против TIGIT согласно любому аспекту настоящего изобретения и/или биспецифического антитела против CTLA4/против PD-1 согласно любому аспекту настоящего изобретения составляет 0,1-100 мг, предпочтительно 1-10 мг на кг массы тела; альтернативно, стандартная доза антитела против TIGIT согласно любому аспекту настоящего изобретения и/или биспецифического антитела против CTLA4/против PD-1 согласно любому аспекту настоящего изобретения составляет 10-1000 мг, предпочтительно 50-500 мг, 100-400 мг, 150-300 мг, 150-250 мг или 200 мг для каждого пациента;

предпочтительно дозу вводят от двух раз в день примерно до одного раза в день или один раз в 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 10 дней, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель или 6 недель;

предпочтительно путь введения представляет собой внутривенную капельную инфузию или внутривенную инъекцию.

Вариабельные области легкой цепи и тяжелой цепи определяют связывание антигена; вариабельная область каждой цепи содержит три гипервариабельных области, называемых областями, определяющими комплементарность (CDR); CDR тяжелой цепи (H) включают HCDR1, HCDR2 и HCDR3, а CDR легкой цепи (L) включают LCDR1, LCDR2 и LCDR3, которые обозначены Kabat et al., см. Bethesda M.d., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 1991; 1-3:91-3242. Учитывая известные последовательности вариабельных областей тяжелой и легкой цепей антитела, существует несколько методов определения областей CDR антитела, включая системы нумерации Kabat, IMGT, Chothia и AbM. Однако применение всех определений CDR для антитела или его варианта должно подпадать под рамки терминов, определенных и используемых в настоящем документе. Если аминокислотная последовательность вариабельной области антитела известна, специалисты в данной области обычно могут определить конкретную CDR, не полагаясь на какие-либо экспериментальные данные, помимо самой последовательности.

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

Аминокислотные последовательности CDR последовательностей моноклональных антител анализируют в соответствии с определением IMGT техническими средствами, хорошо известными специалистам в данной области, например, с использованием базы данных VBASE2.

Антитела 26B12, 26B12H1L1, 26B12H4L1, 26B12H2L2, 26B12H3L2, 26B12H2L3, 26B12H3L3, 26B12H1L4 и 26B12H4L4, вовлеченные в настоящее изобретение, имеют одинаковые CDR:

3 CDR вариабельной области тяжелой цепи имеют следующие аминокислотные последовательности:

HCDR1: GHSFTSDYA (SEQ ID NO: 3)

HCDR2: ISYSDST (SEQ ID NO: 4)

HCDR3: ARLDYGNYGGAMDY (SEQ ID NO: 5);

3 CDR вариабельной области легкой цепи имеют следующие аминокислотные последовательности:

LCDR1: QHVSTA (SEQ ID NO: 8)

LCDR2: SAS (SEQ ID NO: 9)

LCDR3: QQHYITPWT (SEQ ID NO: 10).

В настоящем изобретении, если не указано иное, используемые в настоящем описании научные и технические термины имеют значения, как правило понятные специалистам в данной области. Кроме того, используемые в настоящем описании лабораторные операции с клеточными культурами, молекулярной генетики, химии нуклеиновых кислот и иммунологии являются рутинными процедурами, широко используемыми в соответствующих областях. Между тем, чтобы лучше понять настоящее изобретение, ниже приведены определения и пояснения соответствующих терминов.

В настоящем документе, когда речь идет об аминокислотной последовательности TIGIT (NCBI GenBank ID: NP_776160.2), она включает полноразмерный белок TIGIT, или внеклеточный домен вариабельной области иммуноглобулина (IgV), или фрагмент, содержащий внеклеточный домен вариабельной области иммуноглобулина (IgV); также включены слитые белки TIGIT, например, фрагмент, слитый с фрагментом белка Fc мышинового или человеческого IgG (mFc или hFc). Однако специалистам в данной области техники будет понятно, что в аминокислотной последовательности белка TIGIT мутации или вариации (включая, но не ограничиваясь ими, замены, делеции и/или добавления) могут встречаться естественным образом или могут быть введены искусственно, не влияя на его биологические функции. Следовательно, в настоящем изобретении термин «белок TIGIT» или «TIGIT» должен включать все такие последовательности, включая представленные последовательности и их природные или искусственные варианты. Более того, при описании фрагмента последовательности белка TIGIT оно включает не только фрагмент последовательности, но также соответствующий фрагмент последовательности в его природных или искусственных вариантах.

Используемый в настоящем описании термин EC_{50} относится к концентрации, обеспечивающей 50% максимального эффекта, то есть к концентрации, которая может вызвать 50% максимального эффекта.

Используемый в настоящем описании термин «антитело» относится к молекуле иммуноглобулина, которая обычно состоит из двух пар полипептидных цепей (каждая пара с одной «легкой» (L) цепью и одной «тяжелой» (H) цепью). Легкие цепи антител классифицируются как легкие цепи κ и λ . Тяжелые цепи классифицируются как μ , δ , γ , α или ϵ . Изоотипы антител определяются как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE. В легких цепях и

тяжелых цепях переменная область и константная область связаны областью «J», состоящей примерно из 12 или больше аминокислот, а тяжелая цепь дополнительно содержит область «D», состоящую примерно из 3 или больше аминокислот. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (VH) и константной области тяжелой цепи (CH). Константная область тяжелой цепи состоит из 3 доменов (CH1, CH2 и CH3). Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (VL) и константной области легкой цепи (CL). Константная область легкой цепи состоит из одного домена CL. Константная область антитела может опосредовать связывание иммуноглобулинов с тканями или факторами хозяина, включая связывание различных клеток иммунной системы (например, эффекторных клеток) с первым компонентом (C1q) классической системы комплемента. Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на гиперпеременные области (называемые определяющими комплементарность областями или CDR) и консервативные области, называемые каркасными областями (FR), которые распределяются между CDR. Каждая VH и VL состоит из 3 CDR и 4 FR, расположенных от amino-конца к карбоксильному концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Переменные области (VH и VL) каждой пары тяжелой цепи/легкой цепи образуют сайты связывания антигена соответственно. Отнесение аминокислот к областям или доменам основано на Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, M.d. (1987 и 1991)), или Chothia & Lesk J. Mol. Biol., 1987; 196:901-917; Chothia et al. Nature 1989; 342:878-883 или на определении системы нумерации IMGT, см. определение у Ehrenmann, Francois, Quentin Kaas and Marie-Paule Lefranc. «IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign: a database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MhcSF.» Nucleic acids research 2009; 38(suppl_1): D301-D307. Термин «антитело» не ограничивается каким-либо конкретным способом получения антитела. Например, антитело включает, в частности, рекомбинантное антитело, моноклональное антитело и поликлональное антитело. Антитело может представлять собой антитела разных изотипов, например, IgG (например, подтипы IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), IgA1, IgA2, IgD, IgE или IgM.

Используемый в настоящем описании термин «антигенсвязывающий фрагмент», также известный как «антигенсвязывающая часть», относится к полипептиду, содержащему фрагмент полноразмерного антитела, который сохраняет способность специфически связываться с тем же антигеном, с которым полноразмерное антитело связывается и/или конкурирует с полноразмерным антителом за специфическое связывание с антигеном. См. в целом, *Fundamental Immunology*, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd edition, Raven Press, N.Y. (1989)), которая включена сюда посредством ссылки в полном объеме для всех целей. Антигенсвязывающий фрагмент антитела может быть получен с помощью технологии рекомбинантной ДНК или путем ферментативного, или химического расщепления интактного антитела. В некоторых случаях антигенсвязывающий фрагмент включает Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb, фрагмент области,

определяющей комплементарность (CDR), одноцепочечное антитело (например, scFv), химерное антитело, диантитело и полипептиды, содержащие по меньшей мере часть антитела, достаточную для придания им специфической антигенсвязывающей способности.

Используемый в настоящем описании термин «фрагмент Fd» относится к фрагменту антитела, состоящему из доменов VH и CH1; термин «фрагмент Fv» относится к фрагменту антитела, состоящему из доменов VL и VH одного плеча антитела; термин «фрагмент dAb» относится к фрагменту антитела, состоящему из домена VH (Ward et al., *Nature* 341:544546 (1989)); термин «Fab-фрагмент» относится к фрагменту антитела, состоящему из доменов VL, VH, CL и CH1; термин «фрагмент F(ab')₂» относится к фрагменту антитела, содержащему два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области.

В некоторых случаях антигенсвязывающий фрагмент антитела представляет собой одноцепочечное антитело (например, scFv), в котором домены VL и VH спарены с образованием моновалентной молекулы через линкер, который позволяет им образовывать одну полипептидную цепь (см. например, Bird et al., *Science* 242:423426 (1988) и Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:58795883 (1988)). Такие молекулы scFv могут иметь общую структуру: NH₂-VL-линкер-VH-COOH или NH₂-VH-линкер-VL-COOH. Подходящий линкер предшествующего уровня техники состоит из повторов аминокислотной последовательности GGGGS или их варианта. Например, можно использовать линкер, имеющий аминокислотную последовательность (GGGGS)₄, но также можно использовать его варианты (Holliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448). Другие линкеры, которые можно использовать в настоящем изобретении, описаны Alfthan et al., *Protein Eng.*, 1995; 8:725-731, Choi et al., *Eur. J. Immunol.*, 31: 94-106; Hu et al., (1996), *Cancer Res.*, 56:3055-3061; Kipriyanov et al., (1999), *J. Mol. Biol.*, 293:41-56; and Roovers et al., (2001), *Cancer Immunol.*

В некоторых случаях антигенсвязывающий фрагмент антитела представляет собой диантитело, то есть двухвалентное антитело, в котором домены VH и VL экспрессируются на одной полипептидной цепи. Однако используемый линкер слишком короткий, чтобы обеспечить соединение двух доменов в одну цепь. Таким образом, домены вынуждены соединяться с комплементарными доменами на другой цепи, и образуются два антигенсвязывающих сайта (см., например, Holliger P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:64446448 (1993) и Poljak R.J. et al., *Structure* 2:11211123 (1994)).

В других случаях антигенсвязывающий фрагмент антитела представляет собой «биспецифическое антитело», которое относится к конъюгату, образованному из первого антитела (фрагмента) и второго антитела (фрагмента) или аналога антитела через линкер; способы конъюгации включают, помимо прочего, химическую реакцию, слияние генов и ферментативную реакцию. Антигенсвязывающий фрагмент антитела может представлять собой «полиспецифическое антитело», включая, например, триспецифическое антитело и тетраспецифическое антитело, причем первое представляет собой антитело с тремя

различными видами антигенсвязывающей специфичности, а второе представляет собой антитело с четырьмя различными видами антигенсвязывающей специфичности. Например, разработанный белок с повторами анкирина (DARPin) связан с антителом IgG, фрагментом антитела scFv-Fc или их комбинацией, например, CN104341529A. Финомер анти-IL-17a связывается с антителом против IL-6R, таким как WO2015141862A1.

Антигенсвязывающие фрагменты антител (например, фрагменты антител, описанные выше) могут быть получены из данного антитела (например, моноклонального антитела 26B12H1L1, 26B12H4L1, 26B12H2L2, 26B12H3L2, 26B12H2L3, 26B12H3L3, 26B12H1L4 или 26B12H4L4, представленного в настоящем изобретении) с использованием обычных методов, известных специалистам в данной области (например, технология рекомбинантной ДНК или ферментативное или химическое расщепление), и антигенсвязывающие фрагменты антител проверяют на специфичность таким же образом, как и интактные антитела.

Используемые в настоящем описании термины «mAb» и «моноклональное антитело» относятся к антителу или фрагменту антитела, полученному из группы высоко гомологичных антител, т. е. из группы идентичных молекул антител, за исключением естественных мутаций, которые могут возникнуть спонтанно. Моноклональное антитело обладает высокой специфичностью в отношении одного эпитопа на антигене. Поликлональное антитело по сравнению с моноклональным антителом обычно содержит по меньшей мере 2 или более различных антител, которые, как правило, распознают разные эпитопы на антигене. Моноклональные антитела, как правило, могут быть получены с использованием гибридомной технологии, впервые описанной Kohler et al. (Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity [J]. Nature, 1975; 256(5517): 495), но также могут быть получены с использованием технологии рекомбинантной ДНК (см., например, Патент США 4816567).

Используемый в настоящем описании термин «гуманизованное антитело» относится к антителу или фрагменту антитела, полученному при замене всех или части областей CDR человеческого иммуноглобулина (рецепторного антитела) на области CDR антитела, не являющегося человеческим, (донорное антитело), где донорное антитело может представлять собой антитело, не являющееся человеческим, (например, мышинное, крысиное или кроличье), обладающее ожидаемой специфичностью, аффинностью или реактивностью. Кроме того, некоторые аминокислотные остатки в каркасных областях (FR) рецепторного антитела также могут быть заменены аминокислотными остатками соответствующих антител, не являющихся человеческими, или аминокислотными остатками других антител для дальнейшего улучшения или оптимизации характеристик антитела. Более подробно о гуманизованных антителах см., например, Jones et al., Nature 1986; 321:522-525; Reichmann et al., Nature 1988; 332:323-329; Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 1992; 2:593-596; и Clark M. Antibody humanization: a case of the «Emperor's new clothes»? [J]. Immunol. Today, 2000; 21(8): 397-402.

Используемый в настоящем описании термин «выделенный» относится к

получению искусственным путем из естественного состояния. Если определенное «выделенное» вещество или компонент присутствует в природе, это может быть случай, когда изменение происходит в его естественной среде, или что оно выделено из природной среды, или и то, и другое. Например, определенный невыделенный полинуклеотид или полипептид встречается в природе у определенного животного, и тот же самый полинуклеотид или полипептид высокой чистоты, выделенный из такого природного состояния, называется выделенным полинуклеотидом или полипептидом. Термин «выделенный» не исключает наличия искусственных или синтетических веществ или других примесей, не влияющих на активность вещества.

Используемый в настоящем описании термин «вектор» относится к носителю нуклеиновой кислоты, в который может быть вставлен полинуклеотид. Когда вектор допускает экспрессию белка, кодируемого вставленным полинуклеотидом, такой вектор называют экспрессирующим вектором. Вектор может быть введен в клетку-хозяин путем трансформации, трансдукции или трансфекции, так что элементы генетического вещества, переносимые вектором, могут быть экспрессированы в клетке-хозяине. Векторы хорошо известны специалистам в данной области, включая, но не ограничиваясь ими: плазмиды; фагмиды; космиды; искусственные хромосомы, такие как искусственная дрожжевая хромосома (YAC), искусственная хромосома бактерий (BAC) или искусственная хромосома, полученная из P1 (PAC); фаги, такие как фаги лямбда или фаги M13; и вирусы животных. Вирусы животных, которые можно использовать в качестве векторов, включают, но не ограничиваются ими, ретровирусы (включая лентивирусы), аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса (такие как вирус простого герпеса), поксвирусы, бакуловирусы, папилломавирусы и паповавирусы (такие как SV40). Вектор может содержать множество элементов, которые контролируют экспрессию, включая, но не ограничиваясь ими, промоторные последовательности, последовательности инициации транскрипции, энхансерные последовательности, элементы селекции и репортерные гены. Кроме того, вектор может дополнительно содержать сайт инициации репликации.

Используемый в настоящем описании термин «клетка-хозяин» относится к клеткам, в которые могут быть введены векторы, включая, но не ограничиваясь ими, прокариотические клетки, такие как *E. coli* или *Bacillus subtilis*, грибковые клетки, такие как дрожжевые клетки или *Aspergillus*, клетки насекомых, такие как клетки дрозофилы S2 или Sf9, или животные клетки, такие как фибробласты, клетки CHO, клетки COS, клетки NSO, клетки HeLa, клетки GS, клетки ВНК, клетки HEK 293 или клетки человека.

Используемый в настоящем описании термин «специфическое связывание» относится к реакции неслучайного связывания между двумя молекулами, такой как реакция между антителом и антигеном, на который оно направлено. В некоторых вариантах осуществления антитело, специфически связывающееся с антигеном (или антитело, специфичное к антигену), означает, что антитело связывается с антигеном с аффинностью (KD) меньше чем примерно 10^{-5} M, например, меньше чем примерно 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M или 10^{-10} M или меньше.

Используемый в настоящем описании термин «KD» относится к константе равновесия диссоциации для специфического взаимодействия антитело-антиген, которая используется для описания аффинности связывания между антителом и антигеном. Меньшая константа равновесия диссоциации указывает на более сильное связывание антитела с антигеном и более высокую аффинность между антителом и антигеном. Как правило, антитела связываются с антигенами (например, белком TIGIT) с константой равновесия диссоциации (KD) менее примерно 10^{-5} M, например, менее примерно 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M или 10^{-10} M или менее. KD можно определить с использованием методов, известных специалистам в данной области, например, с использованием прибора молекулярного взаимодействия Fortebio.

Используемые в настоящем описании термины «моноклональное антитело» и «mAb» имеют одинаковое значение и могут использоваться взаимозаменяемо; термины «поликлональное антитело» и «pAb» имеют одинаковое значение и используются взаимозаменяемо; термины «полипептид» и «белок» имеют одинаковое значение и используются взаимозаменяемо. Кроме того, в настоящем описании аминокислоты обычно представлены однобуквенными и трехбуквенными сокращениями, известными в данной области техники. Например, аланин может быть представлен A или Ala.

Используемый в настоящем описании термин «фармацевтически приемлемый носитель и/или вспомогательное вещество» относится к носителю и/или вспомогательному веществу, которые фармакологически и/или физиологически совместимы с объектом и активным ингредиентом. Такие носители и/или вспомогательные вещества хорошо известны в данной области (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, под редакцией Gennaro AR, 19th Ed., Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995), включая, но не ограничиваясь ими: регуляторы pH, поверхностно-активные вещества, адъюванты и усилители ионной силы. Например, регуляторы pH включают, но не ограничиваются ими, фосфатный буфер; поверхностно-активные вещества включают, но не ограничиваются ими, катионные, анионные или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как Tween-80; усилители ионной силы включают, но не ограничиваются ими, хлорид натрия.

Используемый в настоящем описании термин «эффективное количество» относится к количеству, достаточному для получения или, по меньшей мере, частичного получения желаемого эффекта. Например, профилактически эффективное количество против заболевания (например, опухоли) относится к количеству, достаточному для предотвращения, остановки или задержки начала заболевания (например, опухоли); терапевтически эффективное количество относится к количеству, достаточному для излечения или, по меньшей мере, частичной остановки заболевания и его осложнений у пациентов, страдающих этим заболеванием.

Используемые в настоящем описании термины «гибридома» и «гибридная клеточная линия» используются взаимозаменяемо, и когда речь идет о терминах «гибридома» и «гибридная клеточная линия», они также включают субклоны и клетки-

потомки гибридомы.

Термин «однократная лекарственная форма» означает одну фармацевтическую лекарственную форму, такую как инъекционная форма, например, помещенную в ампулу, содержащую биспецифическое антитело против CTLA4/против PD-1 или антитело против TIGIT согласно настоящему изобретению для введения пациенту в определенные моменты схемы, предпочтительно на кг массы тела пациента. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения схема включает, например, введение однократной лекарственной формы в соответствии с циклом введения от двух раз в день до примерно одного раза через день или один раз в 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 10 дней, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель или 6 недель.

В настоящем изобретении термины «первый» (например, первая функциональная область белка или первый линкерный фрагмент) и «второй» (например, вторая функциональная область белка или второй линкерный фрагмент) используются для различия или ясности в экспрессии и не несут в себе типичного значения последовательного расположения, если не указано иное.

«Терапевтически эффективное количество» или «терапевтически эффективная доза» лекарственного средства или терапевтического средства представляет собой любое количество лекарственного средства, которое при использовании отдельно или в комбинации с другим терапевтическим средством защищает пациента от возникновения заболевания или способствует регрессии заболевания, о чем свидетельствует снижение тяжести симптомов заболевания, увеличение частоты и продолжительности периодов без симптомов заболевания или предотвращение повреждений или инвалидности, вызванных заболеванием. Способность терапевтического агента способствовать регрессии заболевания может быть оценена с использованием различных методов, известных практикующим специалистам, например, на человеке в клинических испытаниях, в модельной системе на животных, которая прогнозирует эффективность у человека, или путем определения активности лекарственного средства в анализе *in vitro*.

«Профилактически эффективное количество» лекарственного средства относится к любому количеству лекарственного средства, которое ингибирует возникновение или рецидив злокачественного новообразования при введении отдельно или в комбинации с противоопухолевым средством пациенту с риском развития злокачественного новообразования (например, пациенту, имеющему предзлокачественное состояние) или пациенту с риском рецидива злокачественного новообразования. В некоторых вариантах осуществления профилактически эффективное количество полностью предотвращает возникновение или рецидив злокачественного новообразования. «Ингибирование» возникновения или рецидива злокачественного новообразования означает уменьшение возможности возникновения или рецидива злокачественного новообразования или полное предотвращение возникновения или рецидива злокачественного новообразования.

Положительные эффекты настоящего изобретения

Моноклональные антитела по настоящему изобретению могут очень хорошо

специфически связываться с TIGIT и иметь сильную аффинность. Они уменьшают ингибирующее действие TIGIT на иммунные клетки, способствуют активности Т-клеток, обращают вспять истощение NK-клеток и усиливают уничтожающее действие иммунных клеток на опухоли. Антитело против TIGIT можно использовать для эффективного лечения или профилактики опухолей отдельно или в комбинации с биспецифическим антителом против CTLA4/против PD-1 (и/или химиотерапевтическим лекарственным средством). Антитело против TIGIT обладает фармакологическим эффектом, заключающимся в эффективном ингибировании роста опухоли в комбинации с биспецифическим антителом против CTLA4/против PD-1, и превосходящем отдельное антитело против TIGIT или отдельное биспецифическое антитело против CTLA4/против PD-1, что имеет хорошие перспективы применения и рыночную стоимость.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

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

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

ФИГ. 3: Результаты анализов активности антител 26B12H1L1, 26B12H2L2, 26B12H2L3, 26B12H3L2 и RG6058, конкурирующих с комплексом человеческий CD155-hFc-биотин за связывание с TIGIT-mFc.

ФИГ. 4: Результаты анализов активности антител 26B12H3L3, 26B12H1L4, 26B12H4L1, 26B12H4L4 и RG6058, конкурирующих с комплексом человеческий CD155-hFc-биотин за связывание с TIGIT-mFc.

ФИГ. 5: Результаты анализов константы аффинности 26B12 H3L3 к TIGIT-mFc. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 5 нМ, 1,67 нМ, 0,557 нМ, 0,185 нМ и 0,06 нМ, соответственно.

ФИГ. 6: Результаты анализов константы аффинности 26B12 H1L1 к TIGIT-mFc. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 5 нМ, 1,67 нМ, 0,557 нМ, 0,185 нМ и 0,06 нМ, соответственно.

ФИГ. 7: Результаты анализов константы аффинности 26B12 H2L2 к TIGIT-mFc. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 5 нМ, 1,67 нМ, 0,557 нМ, 0,185 нМ и 0,06 нМ, соответственно.

ФИГ. 8: Результаты анализов константы аффинности 26B12 H2L3 к TIGIT-mFc. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 5 нМ, 1,67 нМ, 0,557 нМ, 0,185 нМ и 0,06 нМ, соответственно.

ФИГ. 9: Результаты анализов константы аффинности 26B12 H3L2 к TIGIT-mFc. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 5 нМ, 1,67 нМ, 0,557 нМ, 0,185 нМ и 0,06 нМ, соответственно.

ФИГ. 10: Результаты анализов константы аффинности 26B12 H4L4 к TIGIT-mFc. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 5 нМ, 1,67 нМ, 0,557 нМ, 0,185 нМ и 0,06 нМ, соответственно.

ФИГ. 11: Результаты анализов константы аффинности 26B12 H1L4 к TIGIT-mFc. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 5 нМ, 1,67 нМ, 0,557 нМ, 0,185 нМ и 0,06 нМ, соответственно.

ФИГ. 12: Результаты анализов константы аффинности 26B12 H4L1 к TIGIT-mFc. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 5 нМ, 1,67 нМ, 0,557 нМ, 0,185 нМ и 0,06 нМ, соответственно.

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

ФИГ. 14: FACS-анализы активности гуманизированных антител 26B12H2L2 и RG6058, связывающихся с поверхностным антигеном TIGIT клеточной мембраны 293T-TIGIT.

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

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

ФИГ. 17: Анализ количества секретируемого IL-2 после добавления антитела TIGIT в клеточные системы Jurkat-TIGIT и HT1080-aCD3scFv.

ФИГ. 18: Эффективность модели опухоли СТ26 трансгенных мышей hTIGIT-BALB/c.

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

ФИГ. 20: Эффективность 26B12H2L2 в комбинации с биспецифическим антителом CP004 (hG1TM) против CTLA4/против PD-1 на модели опухоли СТ26 трансгенных мышей BALB/c-hPD1/hTIGIT.

ФИГ. 21: Изменения массы тела модели опухоли СТ26 трансгенной мыши BALB/c-hPD1/hTIGIT, получавшей 26B12H2L2 в комбинации с биспецифическим антителом CP004 против CTLA4/против PD-1 CP004(hG1TM).

Депонированный биологический материал:

Гибридная клеточная линия LT019 (TIGIT-26B12) была депонирована в Китайском центре сбора типовых культур (ССТСС) 22 октября, 2020, под номером ССТСС NO: C2020208, адресом депозитария является Уханьский университет, Ухань, Китай, почтовый индекс: 430072.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Варианты осуществления настоящего изобретения будут подробно описаны ниже со ссылкой на примеры. Специалистам в данной области будет понятно, что следующие примеры предназначены только для иллюстрации настоящего изобретения и не должны рассматриваться как ограничения объема настоящего изобретения. Когда конкретные

технологии или условия не указаны, Примеры выполняются в соответствии с технологиями или условиями, описанными в публикациях в данной области техники (например, см. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, authored by J. Sambrook et al., и переведено Huang Peitang et al., third edition, Science Press) или согласно листку-вкладышу. Используемые реагенты или инструменты являются обычными коммерчески доступными продуктами, если их производители не указаны. Например, 293Т можно приобрести в АТСС.

В следующих примерах настоящего изобретения используемые мыши BALB/c были приобретены в Медицинском экспериментальном центре животных Гуандуна.

В следующих примерах настоящего изобретения использованное антитело положительного контроля RG6058 имеет последовательность, которую можно найти в последовательности 34 и последовательности 36 в публикации китайского патента № CN108290946.

В следующих примерах настоящего изобретения биспецифическое антитело CP004(hG1TM) против CTLA4/против PD-1, используемое в комбинации, было произведено Akeso Biopharma, Inc., последовательность которого можно найти в публикации патента CN112300286A, со ссылкой на полную последовательность тяжелой цепи (аминокислотная последовательность, представленная в SEQ ID NO: 57, и нуклеотидная последовательность, представленная в SEQ ID NO: 58) CP004(hG1TM) и полную последовательность легкой цепи (аминокислотная последовательность, представленная в SEQ ID NO: 59, и нуклеотидная последовательность, представленная в SEQ ID NO: 60) CP004(hG1TM), и CP004(hG1TM) имеет структуру IgG-scFv, где часть IgG представляет собой антитело против PD1, а часть scFv представляет собой антитело против CTLA4,

где последовательность HCDR1 антитела против PD1 представлена в SEQ ID NO: 61, последовательность HCDR2 представлена в SEQ ID NO: 62, последовательность HCDR3 представлена в SEQ ID NO: 63, последовательность VH представлена в SEQ ID NO: 73, последовательность LCDR1 антитела против PD1 представлена в SEQ ID NO: 70, последовательность LCDR2 представлена в SEQ ID NO: 71, последовательность LCDR3 представлена в SEQ ID NO: 72, и последовательность VL представлена в SEQ ID NO: 76;

последовательность HCDR1 антитела против CTLA4 представлена в SEQ ID NO: 64, последовательность HCDR2 представлена в SEQ ID NO: 65, последовательность HCDR3 представлена в SEQ ID NO: 66, последовательность VH представлена в SEQ ID NO: 74, последовательность LCDR1 антитела против CTLA4 представлена в SEQ ID NO: 67, последовательность LCDR2 представлена в SEQ ID NO: 68, последовательность LCDR3 представлена в SEQ ID NO: 69, и последовательность VL представлена в SEQ ID NO: 75;

Пример 1: Получение антитела 26B12 против TIGIT

1. Получение гибридной клеточной линии LT019.

Антиген, использованный для получения антитела против TIGIT, представлял

собой человеческий TIGIT-mFc (TIGIT представлял собой GenbankID: NP_776160.2; последовательность mFc была представлена в SEQ ID NO: 77). Клетки селезенки иммунизированных мышей сливали с клетками миеломы мышей для получения гибридомных клеток. Используя человеческий TIGIT-mFc в качестве антигена, клетки гибридомы подвергали скринингу с помощью непрямого ИФА для получения гибридомных клеток, способных секретировать антитела, специфически связывающиеся с TIGIT. Гибридомные клетки, полученные скринингом, подвергали лимитирующему разведению для получения стабильной гибридомной клеточной линии. Вышеупомянутая гибридомная клеточная линия была обозначена гибридомной клеточной линией LT019, а моноклональное антитело, секретируемое этой клеточной линией, было обозначено 26B12.

Гибридомная клеточная линия LT019 (также называемая TIGIT-26B12) была депонирована в Китайском центре сбора типовых культур (ССТСС) 22 октября, 2020, под номером ССТСС NO: C2020208, адресом депозитария является Уханьский университет, Ухань, Китай, почтовый индекс: 430072.

2. Получение антитела 26B12 против TIGIT

Полученную выше клеточную линию LT019 культивировали в среде с определенным химическим составом (среда CD, содержащая 1% пенициллина-стрептомицина) при 37°C/5% CO₂. Через 7 дней супернатант клеточной культуры собирали, подвергали высокоскоростному центрифугированию и вакуумной фильтрации через микрофильтрационную мембрану и очищали, используя колонку с белком HiTrap A HP, для получения антитела 26B12.

Пример 2: Анализ последовательности антитела 26B12 против TIGIT

мРНК экстрагировали из клеточной линии LT019, культивированной в Примере 1, в соответствии с методом, описанным в руководстве к набору RNAPrep pure Cell/Bacteria Kit (Tiangen, Cat. No. DP430).

кДНК синтезировали в соответствии с руководством Invitrogen SuperScript® III First-Strand Synthesis System для ОТ-ПЦР и амплифицировали с помощью ПЦР.

ПЦР-амплифицированные продукты подвергали непосредственному ТА-клонированию в соответствии с инструкцией к набору для клонирования pEASY-T1 (Transgen CT101).

Продукты ТА-клонирования секвенировали напрямую, и результаты секвенирования следующие:

Нуклеотидная последовательность варибельной области тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO: 2 длиной 363 п.н.

Кодируемая аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO: 1 длиной 121 аминокислот,

где последовательность тяжелой цепи HCDR1 представлена в SEQ ID NO: 3, последовательность HCDR2 представлена в SEQ ID NO: 4, а последовательность HCDR3 представлена в SEQ ID NO: 5.

Нуклеотидная последовательность варибельной области легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 7 длиной 321 п.н.

Кодируемая аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO: 6 длиной 107 аминокислот,

где последовательность LCDR1 легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 8, последовательность LCDR2 представлена в SEQ ID NO: 9, а последовательность LCDR3 представлена в SEQ ID NO: 10.

Пример 3: Дизайн и получение легких и тяжелых цепей гуманизированных антител против TIGIT человека

1. Дизайн легких и тяжелых цепей гуманизированных антител против TIGIT человека 26B12H1L1, 26B12H4L1, 26B12H2L2, 26B12H3L2, 26B12H2L3, 26B12H3L3, 26B12H1L4 и 26B12H4L4.

На основе трехмерной кристаллической структуры человеческого белка TIGIT и последовательности антитела 26B12, полученной в Примере 2, модель антитела была смоделирована с помощью компьютера и в соответствии с моделью были сконструированы мутации для получения последовательностей варибельной области антител 26B12H1L1, 26B12H4L1., 26B12H2L2, 26B12H3L2, 26B12H2L3, 26B12H3L3, 26B12H1L4 и 26B12H4L4 (последовательности константной области антитела из базы данных NCBI: константная область тяжелой цепи представляет собой С-область цепи гамма-1 Ig, № доступа: P01857; константная область легкой цепи представляет собой С-область каппа-цепи Ig, № доступа: P01834).

Сконструированные последовательности варибельной области показаны в Таблице А ниже.

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

8	26B12H4L4	17	18	25	26
---	-----------	----	----	----	----

Последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепи гуманизированного моноклонального антитела 26B12H1L4.

Для указанных выше 8 антител 26B12H1L1, 26B12H4L1, 26B12H2L2, 26B12H3L2, 26B12H2L3, 26B12H3L3, 26B12H1L4 и 26B12H4L4 длина нуклеотидных последовательностей вариабельных областей тяжелой цепи составляла 363 п.н., а длина кодируемых аминокислотных последовательностей составила 121 а.о.; длина нуклеотидных последовательностей вариабельных областей легкой цепи составляла 321 п.н., а длина кодируемых аминокислотных последовательностей - 107 а.о.

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

Последовательность HCDR1 представлена в SEQ ID NO: 3, последовательность HCDR2 представлена в SEQ ID NO: 4, а последовательность HCDR3 представлена в SEQ ID NO: 5;

последовательность LCDR1 представлена в SEQ ID NO: 8, последовательность LCDR2 представлена в SEQ ID NO: 9, а последовательность LCDR3 представлена в SEQ ID NO: 10.

2. Получение гуманизированных антител 26B12H1L1, 26B12H4L1, 26B12H2L2, 26B12H3L2, 26B12H2L3, 26B12H3L3, 26B12H1L4 и 26B12H4L4.

Все константные области тяжелой цепи представляли собой С-область цепи гамма-1 Ig, № ДОСТУПА: P01857; все константные области легкой цепи представляли собой С-область каппа-цепи Ig, № ДОСТУПА: P01834.

кДНК тяжелой цепи и кДНК легкой цепи 26B12H1L1, кДНК тяжелой цепи и кДНК легкой цепи 26B12H4L1, кДНК тяжелой цепи и кДНК легкой цепи 26B12H2L2, кДНК тяжелой цепи и кДНК легкой цепи 26B12H3L2, кДНК тяжелой цепи и кДНК легкой цепи 26B12H2L3, кДНК тяжелой цепи и кДНК легкой цепи 26B12H3L3, кДНК тяжелой цепи и кДНК легкой цепи 26B12H1L4, кДНК тяжелой цепи и кДНК легкой цепи 26B12H2L4, а также кДНК тяжелой цепи и кДНК легкой цепи 26B12H4L4 были отдельно клонированы в векторы pUC57simple (предоставлено Genscript) с получением pUC57simple-26B12H1, pUC57simple-26B12L1; pUC57simple-26B12H4, pUC57simple-26B12L1; pUC57simple-26B12H2, pUC57simple-26B12L2; pUC57simple-26B12H3, pUC57simple-26B12L2; pUC57simple-26B12H2, pUC57simple-26B12L3; pUC57simple-26B12H3, pUC57simple-26B12L3; pUC57simple-26B12H1, pUC57simple-26B12L4; pUC57simple-26B12H2, pUC57simple-26B12L4; и pUC57simple-26B12H4, pUC57simple-26B12L4, соответственно. Что касается стандартных методов, описанных в Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Second Edition), полноразмерные гены тяжелой и легкой цепей, синтезированные расщеплением EcoRI&HindIII, субклонировали в экспрессирующий вектор pcDNA3.1 путем расщепления ферментом рестрикции EcoRI&HindIII для получения экспрессирующих плазмид pcDNA3.1-26B12H1, pcDNA3.1-26B12L1, pcDNA3.1-26B12H4, pcDNA3.1-26B12H2, pcDNA3.1-26B12L2, pcDNA3.1-26B12H3, pcDNA3.1-26B12L3 и

pcDNA3.1-26B12L4, а также дополнительно секвенировали гены тяжелой/легкой цепи рекомбинантных экспрессирующих плазмид. Затем сконструированные комбинации генов, содержащие соответствующие рекомбинантные плазмиды легкой и тяжелой цепей (pcDNA3.1-26B12H1/pcDNA3.1-26B12L1, pcDNA3.1-26B12H4/pcDNA3.1-26B12L1, pcDNA3.1-26B12H2/pcDNA3.1-26B12L2, pcDNA3.1-26B12H3/pcDNA3.1-26B12L2, pcDNA3.1-26B12H2/pcDNA3.1-26B12L3, pcDNA3.1-26B12H3/pcDNA3.1-26B12L3, pcDNA3.1-26B12H1/pcDNA3.1-26B12L4 и pcDNA3.1-26B12H4/pcDNA3.1-26B12L4) по отдельности совместно трансфецировали в клетки 293F, культуры собирали и очищали. После того, как последовательности были проверены, готовили свободные от эндотоксина экспрессирующие плазмиды, которые транзитивно трансфецировали в клетки НЕК293 для экспрессии антител. Через 7 дней культуры клеток собирали и подвергали аффинной очистке на колонке с Протеином А для получения гуманизированных антител.

Пример 4: Анализы ИФА на активность антител, связывающихся с антигеном TIGIT-mFc

Экспериментальные стадии: козье антитело против мышинового IgG Fc (приобретенное у Jackson, партия № 132560) добавляли в концентрации 2 мкг/мл для покрытия микропланшета и инкубировали при 4°C в течение 16 часов. После инкубации микропланшет, покрытый козым антителом против мышинового IgG Fc, один раз промывали PBST, а затем блокировали раствором PBST, содержащим 1% BSA в качестве раствора, блокирующего микропланшет, на 2 часа. После блокировки микропланшет промывали 3 раза PBST. Затем добавляли 1 мкг/мл антигена в виде человеческого TIGIT-mFc, и планшет инкубировали при 37°C в течение 30 минут, а затем промывали 3 раза PBST. В лунки микропланшета добавляли антитела, серийно разведенные раствором PBST. Градиенты разведения антител показаны в Таблице 1 и Таблице 2. Микропланшет, содержащий тестируемые антитела, инкубировали при 37°C в течение 30 мин, затем 3 раза промывали PBST. После промывки добавляли меченное HRP козье антитело против человеческого IgG Fc (приобретенное у Jackson, партия №. 128332), разбавленное в соотношении 1:5000, и микропланшет инкубировали при 37°C в течение 30 мин. После инкубации планшет промывали 4 раза PBST, добавляли ТМВ (Neogen, 308177) в темноте для хромогенеза в течение 5 мин, затем добавляли стоп-раствор для прекращения хромогенной реакции. Микропланшет немедленно помещали в микропланшет-ридер, и считывали значение оптической плотности каждой лунки микропланшета при 450 нм. Данные анализировали и обрабатывали программой SoftMax Pro 6.2.1.

Результаты связывания антитела с антигеном TIGIT-mFc показаны на ФИГ. 1 и ФИГ. 2. Значения OD для всех дозировок показаны в Таблице 1 и Таблице 2. EC₅₀ антител, связывающихся с антигеном, рассчитывали путем аппроксимации кривой, используя концентрацию антитела по оси абсцисс и значение поглощения по оси ординат. Результаты показаны в Таблице 1 и Таблице 2, и на ФИГ. 1 и ФИГ. 2.

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

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

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

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

Результаты показывают, что антитела 26B12H1L1, 26B12H4L1, 26B12H2L2, 26B12H3L2, 26B12H2L3, 26B12H3L3, 26B12H1L4 и 26B12H4L4 были способны эффективно связываться с человеческим TIGIT-mFc дозозависимым образом, а активность связывания была сопоставима с активностью связывания лекарственного средства RG6058 положительного контроля для той же мишени, что указывает на то, что антитела 26B12H1L1, 26B12H4L1, 26B12H2L2, 26B12H3L2, 26B12H2L3, 26B12H3L3, 26B12H1L4 и 26B12H4L4 обладают функцией эффективного связывания с TIGIT.

Пример 5. Конкурентные анализы ИФА на активность антител, конкурирующих с CD155-hFc-биотин за связывание с TIGIT-mFc.

Стадии эксперимента: Микропланшет покрывали TIGIT-mFc в концентрации 2 мкг/мл и инкубировали при 4°C в течение ночи. После инкубации микропланшет,

покрытый антигеном, один раз промывали PBST, а затем блокировали раствором PBST, содержащим 1% BSA в качестве раствора, блокирующего микропланшет, в течение 2 часов. После блокировки микропланшет промывали 3 раза PBST. В микропланшет добавляли антитела, серийно разведенные раствором PBST. Концентрации антител показаны в Таблице 3 и Таблице 4. После инкубации микропланшета при комнатной температуре в течение 10 минут добавляли равные объемы 2 мкг/мл CD155-hFc-биотин (производства Akeso Biopharma, Inc., партия №. 20170210, где CD155 представлял собой номер доступа GenBank. NP_006496.4, а последовательность hFc представлена в SEQ ID NO: 78; конечная концентрация: 1 мкг/мл) и хорошо перемешивали с антителами. Микропланшет инкубировали при 37°C в течение 30 мин, а затем 3 раза промывали PBST. После промывки добавляли рабочий раствор SA-HRP, разведенный в соотношении 1:4000, и инкубировали микропланшет при 37°C в течение 30 мин. После инкубации планшет 4 раза промывали PBST, добавляли ТМВ (Neogen, 308177) для хромогенеза в темноте в течение 5 мин, а затем добавляли стоп-раствор для остановки хромогенной реакции. Микропланшет немедленно помещали в микропланшет-ридер, и считывали значение оптической плотности каждой лунки микропланшета при 450 нм. Данные анализировали и обрабатывали программой SoftMax Pro 6.2.1.

Результаты активности антител, конкурирующих с CD155-hFc-биотин за связывание с TIGIT-mFc, представлены в Таблице 3 и Таблице 4. EC₅₀ антител, конкурирующих с CD155-hFc-биотин за связывание с TIGIT-mFc, рассчитывали путем аппроксимации кривой с использованием концентрации антитела по оси абсцисс и значения поглощения по оси ординат, а результаты показаны в Таблице 3 и Таблице 4, и на ФИГ. 3 и ФИГ. 4 ниже.

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

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

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

Разведение	антигенное покрытие: TIGIT-mFc (2 мкг/мл)
------------	-------------------------------------------

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

KD - константа аффинности; $KD = k_{dis}/k_{on}$.

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

Результаты показывают, что в зависимости от уровня аффинности для TIGIT-mFc антитела против TIGIT можно перечислить в порядке убывания следующим образом: 26B12H2L2, 26B12H4L1, 26B12H1L1, RG6058, 26B12H4L4, 26B12H1L4, 26B12H2L3, 26B12H3L2 и 26B12H3L3. Среди них гуманизированные антитела 26B12H2L2, 26B12H4L1 и 26B12H1L1 обладают более сильной аффинностью, чем препарат RG6058 положительного контроля, а 26B12H4L4 имеет сравнимую аффинность с препаратом RG6058 положительного контроля.

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

Экспериментальный метод:

Вектор TIGIT plet16.3-TIGITFL-BSD (TIGIT соответствовал GenbankID: NP_776160.2; полноразмерная последовательность кДНК TIGIT человека была оптимизирована и синтезирована с помощью GenScript, обозначена как TIGITFL, и клонирована в вектор pUC57simple (поставленный GenScript) с получением плазмиды pUC57simple-TIGITFL. Плазмиду pUC57simple-TIGITFL синтезировали с помощью двойного ферментативного расщепления BamHI и XhoI; фрагмент целевого гена TIGITFL собирали и субклонировали в экспрессирующий вектор plet16.3 через сайты рестрикции BamHI и XhoI; вектор pLenti6.3 (приобретенный у Invitrogen) использовали для трансфекции клеток 293T, и путем скрининга получали клеточную линию 293T-TIGIT, стабильно экспрессирующую TIGIT.

Клетки 293T-TIGIT собирали (DMEM+10% FBS) и центрифугировали в течение 5 минут, а супернатант отбрасывали. Клетки ресуспендировали, подсчитывали и определяли жизнеспособность клеток (P7, 95,79%). Клетки разводили, в каждую лунку прозрачного 96-луночного планшета с V-образным дном добавляли по 300 тыс. клеток и в каждую пробирку добавляли по 200 мкл 1% PBSA. Смеси центрифугировали в течение 5

мин, супернатанты отбрасывали. В соответствии с планом эксперимента в каждую лунку добавляли по 100 мкл антител (конечная концентрация: 300 нМ, 100 нМ, 33,3 нМ, 11,1 нМ, 3,7 нМ, 1,23 нМ, 0,41 нМ, 0,041 нМ и 0,0041 нМ), а также были разработаны пустой контроль и изотипический контроль. Планшет инкубировали на льду в течение 60 мин. В каждую пробирку добавляли по 200 мкл 1% PBSA. Смеси центрифугировали в течение 5 мин, супернатанты отбрасывали. Планшет промывали дважды. Козьи конъюгированные с FITC антитела против IgG человека (приобретенные у Jackson, кат. № 109-095-098, разбавленные в 500 раз в PBSA) добавляли к каждому образцу и смеси инкубировали на льду в темноте в течение 40 мин. В каждую пробирку добавляли по 200 мкл PBSA. Смеси центрифугировали в течение 5 мин, супернатанты отбрасывали. Клетки ресуспендировали, добавляя 200 мкл PBSA, и суспензии переносили в пробирки для проточной цитометрии для измерения средней интенсивности флуоресценции клеток при каждой концентрации с помощью проточного цитометра.

Таблица 6: Анализы FACS на активность связывания гуманизированных антител 26B12H2L2 и RG6058 с поверхностным антигеном клеточной мембраны TIGIT 293T-TIGIT

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

Результаты эксперимента показаны в Таблице 6 и на ФИГ. 14. EC₅₀ для связывания антитела положительного контроля RG6058 с поверхностным антигеном клеточной мембраны TIGIT составляла 1,257 нМ, а EC₅₀ для связывания гуманизированного антитела 26B12H2L2 с поверхностным антигеном клеточной мембраны TIGIT составляла 0,917 нМ.

Результаты эксперимента демонстрируют, что гуманизированное антитело 26B12H2L2 обладало более сильной способностью связываться с поверхностным антигеном клеточной мембраны TIGIT, чем антитело положительного контроля RG6058.

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

Экспериментальный метод: клетки 293T-TIGIT собирали и центрифугировали в течение 5 минут, супернатант отбрасывали. Клетки ресуспендировали, подсчитывали и определяли жизнеспособность клеток (94,95%). Клетки разводили, в каждую лунку прозрачного 96-луночного планшета с V-образным дном добавляли по 300 тыс. клеток и в каждую пробирку добавляли по 200 мкл 1% PBSA. Смеси центрифугировали в течение 5 мин, супернатанты отбрасывали. В соответствии с планом эксперимента в каждую лунку добавляли по 100 мкл антител (конечная концентрация: 300 нМ, 100 нМ, 33,3 нМ, 11,1 нМ, 3,7 нМ, 1,23 нМ, 0,123 нМ и 0,0123 нМ), а также были разработаны пустой контроль и изотипический контроль. Планшет инкубировали на льду в течение 30 мин. CD155 (конечная концентрация: 10 нМ; производство Akeso Biopharma, Inc., партия №. 20190726,

где CD155 соответствовал номеру доступа GenBank. NP_006496.4) или CD112 (конечная концентрация: 30 нМ; производится Akeso Biopharma, Inc., партия №. 20190726, где CD112 соответствовал номеру доступа GenBank. NP_001036189.1) добавляли к каждому образцу и смеси инкубировали на льду в темноте в течение 60 мин. Затем в каждую пробирку добавляли по 200 мкл 1% PBSA. Смеси центрифугировали в течение 5 мин, супернатанты отбрасывали. Планшет промывали дважды. Козьи APC-антитела против IgG мыши (приобретенные у Biolegend, партия №. 405308, минимальная x-реактивность; разбавленные в 300 раз PBSA) добавляли к каждому образцу и инкубировали смеси на льду в темноте в течение 40 мин. В каждую пробирку добавляли по 200 мкл PBSA. Смеси центрифугировали в течение 5 мин, супернатанты отбрасывали. Клетки ресуспендировали, добавляя 200 мкл PBSA, и суспензии переносили в пробирки для проточной цитометрии для измерения средней интенсивности флуоресценции клеток при каждой концентрации с помощью проточного цитометра.

Результаты эксперимента показаны в Таблице 7 и на ФИГ. 15, а также Таблицу 8 и Фиг. 16.

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

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

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

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

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

Результаты эксперимента демонстрируют, что гуманизированное антитело 26B12H2L2 обладало более сильной способностью конкурировать с CD155 или CD112 за связывание с поверхностным антигеном TIGIT клеточной мембраны, чем антитело

положительного контроля RG6058.

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

Экспериментальный метод:

Трансфекция клеток Jurkat с использованием вектора TIGIT pleti6.3/V5-TIGITFL-BSD (вектор pLenti6.3 был приобретен у Invitrogen) и скрининг для получения клеточной линии клеток Jurkat-TIGIT, стабильно экспрессирующих TIGIT; вектор антитела против CD3 pCDH-aCD3scFv-puro (последовательность кДНК анти-CD3scFv была оптимизирована и синтезирована с помощью GenScript и клонирована в вектор pUC57simple (поставляемый GenScript) с получением плазмиды pUC57simple-anti-CD3scFv. Синтезированную плазмиду pUC57simple-anti-CD3scFv расщепляли двумя ферментами XbaI и BamHI, фрагмент целевого гена анти-CD3scFv собирали и субклонировали в экспрессирующий вектор pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro (приобретенный у Youbio) через сайты рестрикции XbaI и BamHI (последовательность анти-CD3scFv была получена из ссылки: Eukaryotic expression of anti-CD3 single chain Fv antibody gene and the characterization of its bioactivities JOURNAL Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi 20 (5), 552-555 (2004), PUBMED 15367345); Клетки HT-1080 трансфецировали и посредством скрининга получали клеточные линии HT1080-aCD3scFv, которые стабильно экспрессируют анти-CD3scFv на клеточных мембранах.

Собирали клетки Jurkat-TIGIT и HT1080-aCD3scFv в логарифмической фазе роста. В 96-луночные планшеты в каждую лунку добавляли по 50 тысяч клеток Jurkat-TIGIT и в каждую лунку добавляли по 10 тысяч клеток HT1080-aCD3scFv. Добавляли разбавленные антитела (конечная концентрация: 10 нМ, 50 нМ и 250 нМ) и антитело против CD28 человека (приобретено в R&D, кат. No. MAV342-500, 3 мкг/мл). Планшеты инкубировали в инкубаторе в течение 48 часов. Культуральные супернатанты собирали и анализировали на содержание IL-2 с использованием набора IL-2-ИФА.

Результаты эксперимента показаны на ФИГ. 17.

Результаты показывают, что гуманизированное антитело 26B12H2L2 и антитело положительного контроля RG6058 могут стимулировать секрецию IL-2 в системах, а гуманизированное антитело 26B12H2L2 способствует секреции IL-2 до уровней, аналогичных RG6058, в этих концентрациях (10 нМ, 50 нМ, и 250 нМ).

Результаты демонстрируют, что способность гуманизированного антитела 26B12H2L2 индуцировать секрецию клеток IL-2 была сравнима со способностью антитела положительного контроля RG6058.

Пример 10: Терапевтический эффект 26B12H2L2 в отношении ксенотрансплантатных опухолей мыши CT26 у трансгенных мышей hTigit-BALB/c

Трансгенным мышам hTigit-BALB/c (приобретенным у GemPharmatech Co., Ltd, у которых нормальный ген TIGIT был заменен человеческим геном TIGIT) каждой инокулировали 500 тысячами клеток CT26 (клеточная линия клеток рака толстой кишки мыши, приобретенная у ATCC) в спину. В частности, модель опухоли мыши была создана

путем инокуляции 200 мкл клеток СТ26 с концентрацией 25 миллионов/мл каждой мыши. Мышей разделяли на группы по 8 мышей, включая группу изотипического контроля (20 мг/кг внутривнутрибрюшинно два раза в неделю) и группу обработки (20 мг/кг внутривнутрибрюшинно два раза в неделю). Конкретная схема показана в Таблице 9.

Таблица 9: Создание мышинной модели опухоли СТ26 и режима введения антител

Группа	Количество клеток	Количество животных	Моделирование	Схема введения
Изотипический контроль	500 тысяч клеток /на мышь	8	СТ26 клетки: 25 миллионов клеток /мл	hIgG1 20 мг/кг, Внутривнутрибрюшинная инъекция (i.p.), дважды в неделю
26B12H2L2	500 тысяч клеток /на мышь	8	Объем инокуляции: 200 мкл/мышь	26B12H2L2 20 мг/кг, Внутривнутрибрюшинная инъекция (i.p.), дважды в неделю

Результаты эксперимента показаны на ФИГ. 18.

Результаты показывают, что 26B12H2L2 вызывало значительное уменьшение объема опухоли в модели опухоли СТ26 трансгенной мыши hTIGIT-BALB/c.

Результаты показывают, что 26B12H2L2 обладает высокой эффективностью на модели опухоли СТ26 трансгенной мыши hTIGIT-BALB/c, таким образом, обладая потенциалом для лечения и/или предотвращения опухолей, особенно рака толстой кишки.

Между тем, как показано на ФИГ. 19, 26B12H2L2 не влияло на массу тела трансгенных мышей hTIGIT-BALB/c в качестве модели опухоли СТ26, что указывает на то, что антитело 26B12H2L2 не вызывало токсических побочных эффектов у мышей.

Пример 11: Эффективная обработка антителом против TIGIT в комбинации с биспецифическим антителом против CTLA4/против PD-1

Чтобы определить противоопухолевую активность *in vivo* антитела против TIGIT в комбинации с биспецифическим антителом против CTLA4/против PD-1 CP004(hG1TM), клетки СТ26 (клетки рака толстой кишки человека, приобретенные у GemPharmatech Co., Ltd.) сначала подкожно инокулировали самкам мышей BALB/c-hPD1/hTIGIT в возрасте 5-7 недель (приобретенным у GemPharmatech Co., Ltd.), и когда средний объем опухоли достигал 80-120 мм³, мышей случайным образом распределяли на 4 группы по 6 мышей в каждой группе в зависимости от объема опухоли. День распределения по группам определяли как D0, и введение начинали в день распределения по группам D0. Схема в группе комбинированной терапии была следующей: препараты готовили отдельно и вводили последовательно (определенного порядка или временного интервала не требовалось, одна обработка должна проводиться после завершения введения другой). Моделирование и конкретная схема показаны в Таблице 10. После введения измеряли длину и ширину опухолей в каждой группе и рассчитывали объем опухоли.

Таблица 10: Схема дозирования антитела против TIGIT в комбинации с биспецифическим антителом против CTLA4/против PD-1 для обработки опухоли трансплантата СТ26 на мышинной модели BALB/c-hPD1/hTIGIT

Распределение по группам	n	Опухолевый ксенотрансплантат	Условие введения
Изотипический контроль 5 мг/кг	6	СТ26, 5×10^5 клетки, BALB/c-hPD1/hTIGIT мыши, SC	Антитело изотипического контроля hIgG, 5 мг/кг; Вводили внутривентриально дважды в течение 4 недель
CP004(hG1TM) 0,5мг/кг	6		CP004(hG1TM), 0.5 мг/кг, Вводили внутривентриально дважды в течение 4 недель
26B12H2L2 4мг/кг	6		26B12H2L2, 4 мг/кг; Вводили внутривентриально дважды в течение 4 недель
26B12H2L2 4мг/кг, CP004(hG1TM) 0.5мг/кг	6		26B12H2L2, 4 мг/кг; CP004(hG1TM), 0.5 мг/кг; Вводили внутривентриально дважды в течение 4 недель

Результаты показаны на ФИГ. 20. Результаты показывают, что: по сравнению с антителом изотипического контроля hIgG, как CP004(hG1TM), так и 26B12H2L2 может эффективно ингибировать рост опухолей у мышей. Группа CP004(hG1TM) + 26B12H2L2 продемонстрировала синергический противоопухолевый эффект на модели, а комбинированная терапия показала противоопухолевое ингибирование, превосходящее таковое при монотерапии.

Кроме того, как показано на ФИГ. 21, как CP004(hG1TM), так и 26B12H2L2 хорошо переносились мышами с опухолями, как по отдельности, так и в комбинации, и в группах не было обнаружено никакого влияния на массу тела мышей с опухолями.

Хотя были подробно описаны конкретные варианты осуществления настоящего изобретения, специалисты в данной области техники должны понимать, что в эти детали могут быть внесены различные модификации и замены в соответствии со всеми раскрытыми идеями, и все эти изменения должны попадать в объем правовой охраны настоящего изобретения. Полный объем настоящего изобретения определяется прилагаемой формулой изобретения и любым ее эквивалентом.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ (Замечание: Подчеркнуты последовательности CDR)

Аминокислотная последовательность 26B12VH

EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGHSFTSDYAWNWIRQFPGNRLEWMGYISY
SDSTNYNPSLKSRLSITRDTSKNQFFLQMNSVTTEDTATYYCARLDYGNYGGAMDYWG
QGTSVTVSS (SEQ ID NO: 1)

Нуклеотидная последовательность 26B12VH

GAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGACCTGGCCTGGTGAAACCCTCTCAGTCTC
TGTCCCTCACCTGCACTGTCACCTGGCCACTCATTCACCAGTGATTATGCCTGGAAC
TGATCCGGCAGTTTCCAGGAAACAGACTGGAGTGGATGGGCTACATAAGCTACAGT
GATAGCACTAACTACAACCCATCTCTCAAAAGTCGAATCTCTATCACTCGAGACACA

TCCAAGAACCAGTTCTTCTTGCAGATGAATTCTGTGACTACTGAGGACACAGCCACA
TATTACTGTGCAAGATTGGACTATGGTAACTACGGTGGGGCTATGGACTACTGGGGT
CAAGGGACCTCAGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 2)

HCDR1: GHSFTSDYA (SEQ ID NO: 3)

HCDR2: ISYSDST (SEQ ID NO: 4)

HCDR3: ARLDYGNYGGAMDY (SEQ ID NO: 5)

Аминокислотная последовательность 26B12VL

DIVLTQSHEFMSTSLRDRVSITCKSSQHVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRY
TGVDPDRFTGSGSGTDFTFITSSVKAEDLAVYYCQQHYITPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID
NO: 6)

Нуклеотидная последовательность 26B12VL

GATATTGTGCTAACTCAGTCTCACGAATTCATGTCCACCTCATTACGAGACAG
GGTCAGCATCACCTGCAAATCCAGTCAACATGTGAGTACTGCTGTAGCCTGGTATCA
ACAGAAACCAGGACAATCTCCTAACTACTGATTTACTCGGCATCCTACCGGTACAC
TGGAGTCCCTGATCGCTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACGGATTTCACTTTCACCAT
CAGCAGTGTGAAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAACATTATATTAC
TCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATAAAA (SEQ ID NO: 7)

LCDR1: QHVSTA (SEQ ID NO: 8)

LCDR2: SAS (SEQ ID NO: 9)

LCDR3: QQHYITPWT (SEQ ID NO: 10)

Аминокислотная последовательность 26B12H1

DVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGHSFTSDYAWNWRQFPKGLEWIGYISYS
DSTNYNPSLKSRTISRDTSKNQFFLQLNSVTAADTATYYCARLDYGNYGGAMDYWGQ
GTSVTVSS (SEQ ID NO: 11)

Нуклеотидная последовательность 26B12H1

GATGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCCCGGACTGGTGAAGCCTTCCCAGACCC
TGTCTCTGACCTGTACAGTGTCTGGCCACAGCTTCACATCCGACTACGCCTGGAAC
GGATCAGGCAGTTTCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGGCTACATCTCTTATAGC
GACTCCACCAACTATAATCCCTCTCTGAAGAGCCGGATCACCATCAGCAGAGATAC
ATCCAAGAACCAGTTCTTTCTGCAGCTGAACAGCGTGACAGCCGCCGACACCGCCA
CATACTATTGCGCCCGGCTGGACTACGGCAATTATGGCGGAGCCATGGATTACTGGG
GCCAGGGCACCTCCGTGACAGTGAGCTCC (SEQ ID NO: 12)

Аминокислотная последовательность 26B12H2

DVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGHSFTSDYAWSWIRQPPKGLEWIGYISYS
DSTNYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLDYGNYGGAMDYWG
QGTSVTVSS (SEQ ID NO: 13)

Нуклеотидная последовательность 26B12H2

GATGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGACTGGTGAAGCCAAGCCAGACCC
TGTCCCTGACCTGTACAGTGTCCGGCCACTCTTTTACAAGCGACTACGCCTGGTCTTG
GATCAGGCAGCCCCCTGGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGCTACATCTCCTATTCTGA

CAGCACCAACTATAATCCCTCCCTGAAGTCTCGGGTGACCATCTCTAGAGATAACAAG
CAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCCGTGACCGCAGCAGACACAGCCGTGT
ACTATTGCGCCCGGCTGGACTACGGCAATTATGGCGGAGCCATGGATTACTGGGGC
 CAGGGCACCCAGCGTGACAGTGTCTAGC (SEQ ID NO: 14)

Аминокислотная последовательность 26B12H3

DVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGHSFTSDYAWSWIRQPPGKGLEWIGYISYS
DSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCCARLDYGNYGGAMDYWG
 QGTSVTVSS (SEQ ID NO: 15)

Нуклеотидная последовательность 26B12H3

GATGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGACTGGTGAAGCCAAGCCAGACCC
 TGTCCCTGACCTGTACAGTGTCCGGCCACTCTTTTACAAGCGACTACGCCTGGTCTTG
 GATCAGACAGCCCCCTGGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGCTACATCTCCTATTCTGA
CAGCACCAACTATAATCCCTCCCTGAAGTCTAGAGTGACCATCTCTGTGGATAACAAG
CAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCCGTGACCGCAGCAGACACAGCCGTGT
ACTATTGCGCCCGGCTGGACTACGGCAATTATGGCGGAGCCATGGATTACTGGGGC
 CAGGGCACCCAGCGTGACAGTGTCTAGC (SEQ ID NO: 16)

Аминокислотная последовательность 26B12H4

DVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGHSFTSDYAWNWRQFPKGLEWIMGYISY
SDSTNYNPSLKSRITISRDTSKNQFFLQLNSVTAADTATYYCCARLDYGNYGGAMDYWG
 QGTSVTVSS (SEQ ID NO: 17)

Нуклеотидная последовательность 26B12H4

GATGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCCCCGGACTGGTGAAGCCTTCCCAGACCC
 TGTCTCTGACCTGTACAGTGTCTGGCCACAGCTTCACATCCGACTACGCCTGGA
 ACTGGATCAGGCAGTTTCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATGGGCTACATCTCTTATAGC
GACTCCACCAACTATAATCCCTCTCTGAAGAGCCGGATCACCATCAGCAGAGATAC
ATCCAAGAACCAGTTCTTTCTGCAGCTGAACAGCGTGACAGCCGCCGACACCGCCA
CATACTATTGCGCCCGGCTGGACTACGGCAATTATGGCGGAGCCATGGATTACTGGG
 GCCAGGGCACCTCCGTGACAGTGAGCTCC (SEQ ID NO: 18)

Аминокислотная последовательность 26B12L1

DIQMTQSPKSLSTSVGDRVTITCRSSQHVVSTAVAWYQKPGKSPKLLIYSASRYR
 SGVPDFRFSGSGSGLDFFTISSVQPEDFATYYCQOHYITPWTFGGGGTKLEIK (SEQ ID NO:
 19)

Нуклеотидная последовательность 26B12L1

GACATCCAGATGACCCAGTCCCCTAAGTCCCTGTCTACAAGCGTGGGCGATC
 GGGTGACCATCACATGTAGAAGCTCCCAGCACGTGTCTACCGCAGTGGCATGGTAC
CAGCAGAAGCCAGGCAAGAGCCCTAAGCTGCTGATCTATTCCGCCTCTTACAGGTAT
TCCGGAGTGCCAGACCGGTTTAGCGGCTCCGGCTCTGGCACCGATTTACCTTTACA
ATCTCTAGCGTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACATACTATTGCCAGCAGCACTACATC
ACCCCATGGACCTTCGGCGGCGGCACAAAGCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO: 20)

Аминокислотная последовательность 26B12L2

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQH^UVSTALAWYQQKPGKSPKLLIYSASSRYS
GVPDRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDFATYYCQQHYITPWTFGGGKLEIK (SEQ ID NO:
21)

Нуклеотидная последовательность 26B12L2

GACATCCAGATGACCCAGTCCCCTAGCTCCCTGTCTGCCAGCGTGGGCGATA
GGGTGACCATCACATGTAGATCTAGCCCAGCACGTGTCTACAGCCCTGGCATGGTACC
AGCAGAAGCCAGGCAAGAGCCCTAAGCTGCTGATCTACTCCGCCTCCTCTAGGTATT
CTGGAGTGCCAGACCGGTTTTCCGGCTCTGGCAGCGGCACCGATTTACCTTTACAA
TCAGCTCCCTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACATACTATTGCCCAGCAGCACTATATCA
CCCCATGGACCTTCGGCGGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO: 22)

Аминокислотная последовательность 26B12L3

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQH^UVSTALAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLQ
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYITPWTFGGGKLEIK (SEQ ID NO:
23)

Нуклеотидная последовательность 26B12L3

GACATCCAGATGACCCAGTCCCCTAGCTCCCTGAGCGCCTCCGTGGGCGATA
GGGTGACCATCACATGTAGAGCCTCTCAGCACGTGAGCACAGCCCTGGCATGGTAC
CAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTATAGCGCCTCTAGCCTGCA
GTCCGGAGTGCCATCTCGGTTCTCTGGCAGCGGCTCCGGAACCGACTTTACCCTGAC
AATCTCCTCTCTGCAGCCAGAGGATTTGCCACATACTATTGCCCAGCAGCACTACAT
CACCCCATGGACCTTCGGCGGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO: 24)

Аминокислотная последовательность 26B12L4

DIQMTQSPKSMSTSVGDRVTITCRSSQH^UVSTA^VAWYQQKPGKSPKLLIYSASYRY
SGVPDRFSGSGSGTDFTFTISSVQPEDFATYYCQQHYITPWTFGGGKLEIK (SEQ ID NO:
25)

Нуклеотидная последовательность 26B12L4

GACATCCAGATGACCCAGTCCCCTAAGTCCATGTCTACAAGCGTGGGCGACA
GGGTGACCATCACATGTAGAAGCTCCCCAGCACGTGTCTACCGCAGTGGCATGGTAC
CAGCAGAAGCCAGGCAAGAGCCCTAAGCTGCTGATCTATTCCGCCTCTTACAGGTAT
TCCGGAGTGCCAGACCGGTTTAGCGGCTCCGGCTCTGGCACCGATTTACCTTTACA
ATCTCTAGCGTGCAGCCAGAGGACTTCGCCACATACTATTGCCCAGCAGCACTACATC
ACCCCATGGACCTTCGGCGGGCGGCACAAAGCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO: 26)

Далее представлена последовательность CTLA4-PD1

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи 14C12

EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGF^AFSSYDMSWVRQTPEKRL^EWVATISGG
GRYTYYPDSVKGRFTISRDNARNTLYLQMSLRSED^TALYYCANRYGEAWFAYWGQG
TLVTVSA (SEQ ID NO: 27)

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи 14C12

DIKMTQSPSSMYASLGERVTFTCKASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLV
DGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSEYEDMGIYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK (SEQ ID

NO: 28)

HCDR1 14C12: Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr Asp (SEQ ID NO: 29)

HCDR2 14C12: Ile Ser Gly Gly Gly Arg Tyr Thr (SEQ ID NO: 30)

HCDR3 14C12: Ala Asn Arg Tyr Gly Glu Ala Trp Phe Ala Tyr (SEQ ID NO: 31)

LCDR1 14C12: Gln Asp Ile Asn Thr Tyr (SEQ ID NO: 32)

LCDR2 14C12: Arg Ala Asn (SEQ ID NO: 33)

LCDR3 14C12: Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu Thr (SEQ ID NO: 34)

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи 4G10

QVKLQESGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKNLEWIGLINPY
NNITNYNQKFMGKATFTVDKSSSTAYMELLRLTSEDSGVYFCARLDYRSYWGQGLTVT
VSAAKTTPPSVY (SEQ ID NO: 35)

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи 4G10

QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNFANWVQEKPDHLFTSLIGGTNN
RAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNHWVFGGGTKLTVLGQPKS
SPSVTLFQGQFC (SEQ ID NO: 36)

HCDR1 4G10: Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr (SEQ ID NO: 37)

HCDR2 4G10: Ile Asn Pro Tyr Asn Asn Ile Thr (SEQ ID NO: 38)

HCDR3 4G10: Ala Arg Leu Asp Tyr Arg Ser Tyr (SEQ ID NO: 39)

LCDR1 4G10: Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Phe (SEQ ID NO: 40)

LCDR2 4G10: Gly Thr Asn (SEQ ID NO: 41)

LCDR3 4G10: Ala Leu Trp Tyr Ser Asn His Trp Val (SEQ ID NO: 42)

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи

14C12H1L1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATISG
GGRYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWQQ
GTLVTVSS (SEQ ID NO: 43)

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи

14C12H1L1

DIQMTQSPSSMSASVGDRVFTFCRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLV
SGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK (SEQ ID
NO: 44)

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи

4G10H1L1

QVQLVESGAELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKQAPGQGLEWIGLINP
YNNITNYNQKFMGKATFTVDKSI STAYMEL SRLTSDDSGVYFCARLDYRSYWGQGLTV
TVSA (SEQ ID NO: 45)

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи

4G10H3L3

QVQLVESGAEVKKPGASVKV SCKASGYSFTGYTMNWVRQAPGQGLEWIGLINP
YNNITNYAQKFQGRVFTVDTSI STAYMEL SRLRSDDTGVYFCARLDYRSYWGQGLTV

TVSA (SEQ ID NO: 46)

Аминокислотная последовательность 4G10H1V(M)

QVQLVESGAELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKQAPGQCLEWIGLINP
YNNITNYNQKFMGKATFTVDKSISTAYMELSRLLTSDDSGVYFCARLDYRSYWGQGTLV

TVSA (SEQ ID NO: 47)

Аминокислотная последовательность 4G10H3V(M)

QVQLVESGAEVKKPGASVKVSKASGYSFTGYTMNWVRQAPGQCLEWIGLINP
YNNITNYAQKFQGRVTFTVDTSISTAYMELSRLLRSDDTGVIYFCARLDYRSYWGQGTLV

TVSA (SEQ ID NO: 48)

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи
4G10H1L1

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNPFANWVQEKPGQAFRSLIGGTN
NRASWVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEAEYFCALWYSNHWVFGGGTKLTVL

(SEQ ID NO: 49)

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи
4G10H3L3

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNFPNWVQQKPGQAPRSLIGGTN
NKASWTPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEAEYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL

(SEQ ID NO: 50)

Аминокислотная последовательность 4G10L1V(M)

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNPFANWVQEKPGQAFRSLIGGTN
NRASWVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEAEYFCALWYSNHWVFGCGTKLTVLR

(SEQ ID NO: 51)

Аминокислотная последовательность 4G10L3V(M)

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNFPNWVQQKPGQAPRSLIGGTN
NKASWTPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEAEYYCALWYSNHWVFGCGTKLTVLR

(SEQ ID NO: 52)

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи фрагмента иммуноглобулина в
CP004(hG1TM)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATISG
GGRYTYYPDSVKGRFTISRDNKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQ
GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
PAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK (SEQ ID NO: 53)

кодируемая аминокислотная последовательность легкой цепи 14C12H1L1
(14C12L1): (214 а.о.)

DIQMTQSPSSMSASVGDRTFTCRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLV

SGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELKRITVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYS
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 54)

Аминокислотная последовательность Линкер1: GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 55)

Аминокислотная последовательность Линкер2: GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 56)

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи CP004(hG1TM)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATISGGGRYT
YYPDSVKGRFTISRDN SKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQGLVT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA
AGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYIT
LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
QVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMNWVRQAPGQCLEWIGLINPYNIT
NYAQKFQGRVTFVDT SISTA YMELSRLRSDDTGVYFCARLDYRSYWGQGLVTVSAG
GGGSGGGGSGGGGSGGGGSQAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNFPNWVQ
QKPGQAPRSLIGGTNNKASWTPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEAEYYCALWYSNH
WVFGCGTKLTVLR (SEQ ID NO: 57)

Нуклеотидная последовательность тяжелой цепи CP004(hG1TM)

GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGCCC GGCGGGTCA
CTGCGACTGAGCTGCGCAGCTTCCGGATTCGCCTTTAGCTCCTACGACATGTCCTGG
GTGCGACAGGCACCAGGAAAGGGACTGGATTGGGTGCTACTATCTCAGGAGGCGG
GAGATACACCTACTATCCTGACAGCGTCAAGGGCCGGTTCACAATCTCTAGAGATA
ACAGTAAGAACAATCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCTGAGGACACCGCA
CTGTACTATTGTGCCAACCGCTACGGGGAAGCATGGTTTGCCTATTGGGGGCAGGGA
ACCCTGGTGACAGTCTCTAGTGCCAGCACCAAAGGGCCAGCGTGTTCCTCTCGCC
CCCTCCTCCAAAAGCACCGAGCGGAGGAACCGCTGCTCTCGGATGTCTGGTGAAGGA
CTACTTCCCTGAACCCGTCACCGTGAGCTGGAATAGCGGCGCTCTGACAAGCGGAGT
CCATACATTCCCTGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGACTCTATTCCCTGTCCAGCGTCGT
CACAGTGCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTCAACCACA
AGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAAATCCTGCGACAAGACA
CACACCTGTCCCCCTGTCCTGCTCCC GAAGCTGCTGGAGCCCTAGCGTCTTCCTCT
TTCCTCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCAGCAGAACCCTGAAGTCACCTGTG
TCGTCGTGGATGTCAGCCATGAGGACCCCGAGGTGAAATTCAACTGGTATGTCGATG
GCGTCGAGGTGCACAACGCCAAAACCAAGCCCAGGGAGGAACAGTACA ACTCCACC
TACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTCTCCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGA
GTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCTCTCCCTGCCCCCATGAGAAGACCATCA

GCAAGGCCAAAGGCCAACCCAGGGAGCCCCAGGTCTATACACTGCCTCCCTCCAGG
 GACGAACTCACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTTTATCCC
 AGCGACATCGCCGTCGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCCAGAGAATAACTACAAGAC
 CACCCCTCCTGTCTCGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTGTACAGCAAAGTACCGTG
 GATAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAATGTCTTTTCATGTTCCGTGATGCACGAGGCA
 CTGCACAACCACTATAACCAGAAGTCTCTGAGTCTGTCACCAGGAAAAGGAGGAGG
 AGGCTCTGGAGGAGGCGGAAGTGGAGGCGGAGGATCAGGAGGGGGAGGATCTCAG
 GTGCAGCTGGTTCGAATCCGGAGCCGAGGTGAAGAAACCCGGCGCTTCCGTGAAGGT
 CTCTTGCAAAGCATCAGGCTACAGCTTACAGGGTATACTATGAACTGGGTGCGGCA
 GGCACCTGGACAGTGTCTGGAATGGATCGGCCTGATTAACCCATAACAACATCA
 CTAACCTACGCCAGAAGTTCAGGGGCCGGGTGACTTTTACCGTGGACACTAGCATT
 CCACCGCTTACATGGAGCTGAGTCGGCTGAGATCAGACGATACCGGCGTGTATTTTT
 GCGCAAGGCTGGATTACAGAAGTTATTGGGGACAGGGAACACTTGTTACAGTCTCT
 GCTGGAGGAGGCGGATCTGGAGGAGGAGGATCTGGCGGAGGAGGCAGTGGAGGAG
 GAGGATCACAGGCTGTGGTTACTCAGGAACCAAGCCTGACCGTGAGCCCCGGAGGC
 ACAGTCACTCTGACCTGTGGGAGCTCCACAGGAGCTGTGACCACATCTAACTTCCT
 AATTGGGTGCAGCAGAAGCCAGGACAGGCACCTCGATCCCTGATCGGGGGAACCAA
 CAACAAGGCCAGCTGGACACCCGCCAGATTTTCTGGCAGTCTGCTGGGCGGGAAAG
 CCGCTCTGACCATTAGCGGCGCTCAGCCTGAGGACGAAGCAGAGTACTATTGCGCC
 CTGTGGTATAGTAATCATTGGGTGTTCCGGGTGTGGGACAAAAGTACCGTGCTGAGA
 (SEQ ID NO: 58)

Аминокислотная последовательность легкой цепи CP004(hG1TM)

DIQMTQSPSSMSASVGDRTFTCRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLV
 SGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELKRTVAAPSV
 FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
 LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 59)

Нуклеотидная последовательность легкой цепи CP004(hG1TM)

GACATTCAGATGACTCAGAGCCCCTCCTCCATGTCCGCCTCTGTGGGCGACAGGGTC
 ACCTTCACATGCCGCGCTAGTCAGGATATCAACACCTACCTGAGCTGGTTTCAGCAG
 AAGCCAGGAAAAGCCCCAAGACACTGATCTACCGGGCTAATAGACTGGTGTCTGG
 AGTCCCAAGTCGGTTCAGTGGCTCAGGGAGCGGACAGGACTACACTCTGACCATCA
 GCTCCCTGCAGCCTGAGGACATGGCAACCTACTATTGCCTGCAGTATGATGAGTTCC
 CACTGACCTTTGGCGCCGGGACAAAAGTGGAGCTGAAGCGAACTGTGGCCGCTCCC
 TCCGTCTTCATTTTTCCCCTTCTGACGAACAGCTGAAATCAGGCACAGCCAGCGTG
 GTCTGTCTGCTGAACAATTTCTACCCTAGAGAGGCAAAAGTGCAGTGGAAAGGTCTGA
 TAACGCCCTGCAGTCCGGCAACAGCCAGGAGAGTGTGACTGAACAGGACTCAAAAG
 ATAGCACCTATTCCCTGTCTAGTACACTGACTCTGTCCAAGGCTGATTACGAGAAGC
 ACAAAGTGTATGCATGCGAAGTGACACATCAGGGACTGTCAAGCCCCGTGACTAAG
 TCTTTTAACCGGGGCGAATGT (SEQ ID NO: 60)

Аминокислотная последовательность CDR тяжелой цепи CP004(hG1TM)

HCDR1: GFAFSSYD (SEQ ID NO: 61)
 HCDR2: ISGGGRYT (SEQ ID NO: 62)
 HCDR3: ANRYGEAWFAY (SEQ ID NO: 63)
 HCDR4: GYSFTGYT (SEQ ID NO: 64)
 HCDR5: INPYNNIT (SEQ ID NO: 65)
 HCDR6: ARLDYRSY (SEQ ID NO: 66)
 HCDR7: TGAVTTSNF (SEQ ID NO: 67)
 HCDR8: GTN (SEQ ID NO: 68)
 HCDR9: ALWYSNHWV (SEQ ID NO: 69)

Аминокислотная последовательность CDR легкой цепи CP004(hG1TM)

LCDR1: QDINTY (SEQ ID NO: 70)
 LCDR2: RAN (SEQ ID NO: 71)
 LCDR3: LQYDEFPLT (SEQ ID NO: 72)

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи CP004(hG1TM)

VH1:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATISGGGRYT
 YYPDSVKGRFTISRDN SKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQGLT
 VSS (SEQ ID NO: 73)

VH2:

QVQLVESGAEVKKPGASVKVSKKASGYSFTGYTMNWVRQAPGQCLEWIGLINPYNNIT
 NYAQKFQGRVTFVDTSTAYMELSRLSDDTGVYFCARLDYRSYWGQGLTVT
 VSA (SEQ ID NO: 74)

VH3:

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNFPNWVQQKPGQAPRSLIGGTNNKASW
 TPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEAEYYCALWYSNHWVFGCGTKLTVLR (SEQ ID
 NO: 75)

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи CP004(hG1TM)

DIQMTQSPSSMSASVGDRTFTCRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLV
 SGVPSRFSGSGGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK (SEQ ID
 NO: 76)

Аминокислотная последовательность mFc:

PRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFFPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISW
 FVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHGDWMSGKEFKCKVNNKDLPIERTI
 SKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNT
 EPVLDSGYSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK (SEQ
 ID NO: 77)

Последовательность hFc

THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW

YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK (SEQ ID
NO: 78)

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция или набор, содержащий антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент и биспецифическое антитело против CTLA4/против PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, где необязательно фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель и/или вспомогательное вещество,

где антитело против TIGIT содержит HCDR1-HCDR3, содержащиеся в переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 1, и LCDR1-LCDR3, содержащиеся в переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 6 (предпочтительно, согласно системе нумерации IMGT антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую HCDR1-HCDR3, имеющие аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 3-5, соответственно, и переменную область легкой цепи, содержащую LCDR1-LCDR3, имеющие аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO: 8-10, соответственно),

и биспецифическое антитело против CTLA4/против PD-1 содержит:

первую функциональную область белка, нацеленную на PD-1, и

вторую функциональную область белка, нацеленную на CTLA4,

где первая функциональная область белка представляет собой иммуноглобулин, а вторая функциональная область белка представляет собой одноцепочечное антитело, или первая функциональная область белка представляет собой одноцепочечное антитело, а вторая функциональная область белка представляет собой иммуноглобулин,

где

иммуноглобулин содержит HCDR1-HCDR3 (предпочтительно HCDR1-HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 29-31, соответственно) в переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 27, и LCDR1-LCDR3 (предпочтительно LCDR1-LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 32-34, соответственно) в переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 28; одноцепочечное антитело содержит HCDR1-HCDR3 (предпочтительно HCDR1-HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 37-39, соответственно) в переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 35, и LCDR1-LCDR3 (предпочтительно LCDR1-LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 40-42, соответственно) в переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 36;

или

иммуноглобулин содержит HCDR1-HCDR3 (предпочтительно HCDR1-HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 37-39, соответственно) в переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 35, и LCDR1-LCDR3 (предпочтительно LCDR1-LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 40-42, соответственно) в переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 36; одноцепочечное антитело содержит HCDR1-HCDR3 (предпочтительно HCDR1-HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 29-31, соответственно) в переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 27, и LCDR1-LCDR3 (предпочтительно LCDR1-LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 32-34,

соответственно) в вариабельной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 28.

2. Фармацевтическая композиция или набор по п. 1, где аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела против TIGIT выбрана из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 17, а аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи антитела против TIGIT выбрана из SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 25;

предпочтительно, для антитела против TIGIT или его антигенсвязывающего фрагмента,

вариабельная область тяжелой цепи антитела имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, а вариабельная область легкой цепи антитела имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6;

вариабельная область тяжелой цепи антитела имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, а вариабельная область легкой цепи антитела имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19;

вариабельная область тяжелой цепи антитела имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17, а вариабельная область легкой цепи антитела имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19;

вариабельная область тяжелой цепи антитела имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, а вариабельная область легкой цепи антитела имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21;

вариабельная область тяжелой цепи антитела имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13, а вариабельная область легкой цепи антитела имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23;

вариабельная область тяжелой цепи антитела имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15, а вариабельная область легкой цепи антитела имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21;

вариабельная область тяжелой цепи антитела имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15, а вариабельная область легкой цепи антитела имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23;

вариабельная область тяжелой цепи антитела имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, а вариабельная область легкой цепи антитела имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25; или

вариабельная область тяжелой цепи антитела имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17, а вариабельная область легкой цепи антитела имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25;

предпочтительно, для антитела против TIGIT или его антигенсвязывающего фрагмента антитело содержит область, отличную от CDR, полученную из вида, отличного от мыши, например, из человеческого антитела;

предпочтительно, для антитела против TIGIT или его антигенсвязывающего фрагмента антитело содержит константную область тяжелой цепи, которая представляет собой С-область цепи гамма-1 Ig (например, № доступа NCBI: P01857), и константную область легкой цепи, которая представляет собой С-область каппа-цепи Ig (например, № доступа NCBI: P01834);

предпочтительно, для антитела против TIGIT или его антигенсвязывающего фрагмента антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент выбрано из Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb, фрагмента области, определяющий комплементарность, одноцепочечного антитела, гуманизированного антитела, химерного антитела или диантитела;

предпочтительно, для антитела против TIGIT или его антигенсвязывающего фрагмента антитело связывается с TIGIT-mFc с KD менее 4E-10 или менее 4E-11; предпочтительно KD измеряют прибором молекулярного взаимодействия ForteBio;

предпочтительно, для антитела против TIGIT или его антигенсвязывающего фрагмента антитело связывается с TIGIT-mFc с EC₅₀ менее 1,5 нМ, менее 1,2 нМ или менее 1 нМ; предпочтительно EC₅₀ измеряют с помощью проточного цитометра;

предпочтительно антитело против TIGIT представляет собой моноклональное антитело, гуманизированное антитело, химерное антитело или полиспецифическое антитело (например, биспецифическое антитело);

предпочтительно антигенсвязывающий фрагмент выбран из Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb, Fab/c, фрагмента области, определяющей комплементарность, одноцепочечного антитела (например, scFv), гуманизированного антитела, химерного антитела или биспецифического антитела;

предпочтительно, для антитела против TIGIT или его антигенсвязывающего фрагмента антитело представляет собой антитело, продуцируемое гибридной клеточной линией LT019, депонированной в Китайском центре коллекций типовых культур (ССТСС) с номером доступа ССТСС NO: C2020208.

3. Фармацевтическая композиция или набор по п. 1 для биспецифического антитела против CTLA4/против PD-1, где аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина выбрана из SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 43, или последовательности, имеющей по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по

ID NO: 36, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51 и SEQ ID NO: 52, или последовательности имеющей по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% гомологии с ними; аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи одноцепочечного антитела выбрана из SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 43, или последовательности, имеющей по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% гомологии с ними; аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи одноцепочечного антитела выбрана из SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 44, или последовательности, имеющей по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% гомологии с ними;

предпочтительно, для биспецифического антитела против CTLA4/против PD-1 биспецифическое антитело выбрано из любого из следующих (1)-(20):

(1) вариабельная область тяжелой цепи иммуноглобулина имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 27, или последовательность, имеющую по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% гомологии с ней, и вариабельная область легкой цепи иммуноглобулина имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 28, или последовательность, имеющую по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере

последовательность, имеющую по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% гомологии с ней;

предпочтительно, для биспецифического антитела против CTLA4/против PD-1,

тяжелая цепь иммуноглобулина имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 53, или последовательность, имеющую по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% гомологии с ней, и его легкая цепь имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 54, или последовательность, имеющую по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% гомологии с ней;

предпочтительно, для биспецифического антитела против CTLA4/против PD-1 первая функциональная область белка связана со второй функциональной областью белка либо непосредственно, либо через линкерный фрагмент, и/или переменная область тяжелой цепи одноцепочечного антитела связана с переменной областью легкой цепи одноцепочечного антитела либо непосредственно, либо через линкерный фрагмент;

предпочтительно, для биспецифического антитела против CTLA4/против PD-1 линкерный фрагмент представляет собой $(GGGGS)_n$, где n представляет собой положительное целое число; предпочтительно n равно 1, 2, 3, 4, 5 или 6;

предпочтительно, для биспецифического антитела против CTLA4/против PD-1 количество первой функциональной области белка и второй функциональной области белка независимо составляет 1, 2 или более;

предпочтительно, для биспецифического антитела против CTLA4/против PD-1 одноцепочечное антитело (предпочтительно переменная область тяжелой цепи) связано с С-концом тяжелой цепи иммуноглобулина;

предпочтительно, для биспецифического антитела против CTLA4/против PD-1, иммуноглобулин относится к подтипу IgG1 человека,

где, согласно системе нумерации EU, константная область тяжелой цепи иммуноглобулина имеет одну из комбинаций следующих мутаций:

L234A и L235A; или

L234A и G237A; или

L235A и G237A; или

L234A, L235A и G237A;

предпочтительно, для биспецифического антитела против CTLA4/против PD-1 биспецифическое антитело содержит:

первую функциональную область белка, нацеленную на PD-1, и

вторую функциональную область белка, нацеленную на CTLA4,

количество первой функциональной области белка равно 1, а количество второй функциональной области белка равно 2;

где первая функциональная область белка представляет собой иммуноглобулин, а вторая функциональная область белка представляет собой одноцепочечное антитело;

тяжелая цепь иммуноглобулина имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 53, или последовательность, имеющую по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% гомологии с ней, и его легкая цепь имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 54, или последовательность, имеющую по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% гомологии с ней;

вариабельная область тяжелой цепи одноцепочечного антитела имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 48, или последовательность, имеющую по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% гомологии с ней, и вариабельная область легкой цепи одноцепочечного антитела имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 52, или

последовательность, имеющую по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% гомологии с ней;

одноцепочечное антитело связано с С-концом тяжелой цепи иммуноглобулина;

первая функциональная область белка связана со второй функциональной областью белка через первый линкерный фрагмент; переменная область тяжелой цепи одноцепочечного антитела связана с переменной областью легкой цепи одноцепочечного антитела через второй линкерный фрагмент; первый линкерный фрагмент и второй линкерный фрагмент идентичны или различны;

предпочтительно, каждый из первого линкерного фрагмента и второго линкерного фрагмента имеет аминокислотную последовательность, независимо выбранную из SEQ ID NO: 55 и SEQ ID NO: 56;

предпочтительно, аминокислотные последовательности первого линкерного фрагмента и второго линкерного фрагмента представлены в SEQ ID NO: 56.

предпочтительно, тяжелая цепь биспецифического антитела против CTLA4/против PD-1 имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 57, легкая цепь имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 59, и биспецифическое антитело имеет структуру IgG-scFv, где часть IgG представляет собой антитело против PD1, а часть scFv представляет собой антитело против CTLA4,

где последовательность HCDR1 антитела против PD1 представлена в SEQ ID NO: 61, последовательность HCDR2 представлена в SEQ ID NO: 62, последовательность HCDR3 представлена в SEQ ID NO: 63, последовательность VH представлена в SEQ ID NO: 73, последовательность LCDR1 антитела против PD1 представлена в SEQ ID NO: 70, последовательность LCDR2 представлена в SEQ ID NO: 71, последовательность LCDR3 представлена в SEQ ID NO: 72, и последовательность VL представлена в SEQ ID NO: 76;

последовательность HCDR1 антитела против CTLA4 представлена в SEQ ID NO: 64, последовательность HCDR2 представлена в SEQ ID NO: 65, последовательность HCDR3 представлена в SEQ ID NO: 66, последовательность VH представлена в SEQ ID NO: 74, последовательность LCDR1 антитела против CTLA4 представлена в SEQ ID NO: 67, последовательность LCDR2 представлена в SEQ ID NO: 68, последовательность LCDR3 представлена в SEQ ID NO: 69, и последовательность VL представлена в SEQ ID NO: 75;

4. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-3, где антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент и антитело против CTLA4/против PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент присутствуют в массовом соотношении 1:5-5:1 в пересчете на антитела, например, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 или 5:1.

5. Набор, содержащий первый продукт и второй продукт в отдельных упаковках, где

первый продукт содержит антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент, по любому из пп. 1-4;

второй продукт содержит биспецифическое антитело против CTLA4/против PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, по любому из пп. 1-4;

предпочтительно, набор дополнительно содержит третий продукт в отдельной упаковке, содержащий одно или более химиотерапевтических лекарственных средств,

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

предпочтительно, комбинированный продукт дополнительно содержит листок-вкладыш;

предпочтительно, для набора, антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент и биспецифическое антитело против CTLA4/против PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент присутствуют в массовом соотношении 1:5-5:1 в пересчете на антитела, например 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 или 5:1.

6. Способ лечения и/или предотвращения опухоли, включающий: введение пациенту эффективного количества антитела против TIGIT или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-4 и/или биспецифического антитела против CTLA4/против PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-4;

где предпочтительно одно или более лекарственных средств дополнительно вводят в комбинации (например, химиотерапевтический агент или ингибитор роста, терапевтический агент направленного действия, конъюгат антитело-лекарственное средство, антиметаболит, антибиотик, антигормональный агент, противоопухолевый агент растительного происхождения и/или гормональное лекарственное средство), где предпочтительно лекарственное средство выбрано из одного или более из следующих лекарственных средств: адриамицин, тамоксифен, мегестрол, аспарагиназа, лекарственное средство на основе платины (например, цисплатин, карбоплатин или оксалиплатин), противоопухолевое средство на основе фторурацила, циклофосфамид, пеметрексед, паклитаксел, алкалоиды барвинка, адриамицин, гозерелин, алкилирующий агент, антрациклин, антиандрогенный агент, ингибитор ароматазы, ингибитор протеинкиназы (например, ингибитор тирозинкиназы), ингибитор липидкиназы, антисмысловый олигонуклеотид, рибозим, ингибитор топоизомеразы, цитотоксический агент, противоопухолевый антибиотик, протеасомный ингибитор, антимицротрубочковый агент, антагонист EGFR, ретиноид, ингибитор гистондеацетилазы, ингибитор B-raf, ингибитор MEK, ингибитор K-ras, ингибитор c-Met, ингибитор Alk, ингибитор фосфатидилинозитол-3-киназы, ингибитор Akt, ингибитор mTOR, двойной ингибитор фосфатидилинозитол-3-киназы и mTOR, майтанзин, монометил ауристатин Е, калихеамицин, эсперамицин и радиоизотопный хелатирующий агент;

предпочтительно антитело против TIGIT, биспецифическое антитело против

CTLA4/против PD-1 и противоопухолевое химиотерапевтическое лекарственное средство вводят одновременно или последовательно; более предпочтительно антитело против TIGIT и биспецифическое антитело против CTLA4/против PD-1 вводят до или после хирургического лечения и/или до или после лучевой терапии;

предпочтительно антитело против TIGIT, биспецифическое антитело против CTLA4/против PD-1 и/или химиотерапевтическое лекарственное средство находятся в форме, подходящей для внутривенной инъекции или внутривенной капельной инфузии, предпочтительно в жидкой форме;

предпочтительно опухоль выбрана из одной или более из следующих:

рак молочной железы, рак яичников, колоректальный рак, опухоль шейки матки, множественная миелома, неходжкинская лимфома, В-лимфома, плазмоклеточный рак, рак головы и шеи, рак головного мозга, рак горла, рак носоглотки, рак пищевода, плоскоклеточный рак пищевода, рак щитовидной железы мезотелиома, аденокарцинома (например, рак поджелудочной железы), рак легких (например, немелкоклеточный рак легкого и мелкоклеточный рак легкого), рак молочной железы, рак печени (например, гепатоцеллюлярная карцинома и гепатобилиарный рак), рак желудка, рак желудочно-кишечного тракта, рак кишечника (например, рак толстой кишки и колоректальный рак), рак желчевыводящих путей (например, холангиокарцинома), рак почки, рак фаллопиевых труб, рак эндометрия, рак шейки матки, рак мочевого пузыря, уротелиальная карцинома, рак предстательной железы, рак яичек, рак кожи, меланома, миелома (например, множественная миелома), неходжкинская лимфома, В-лимфома, плазмоклеточная карцинома, лейкоз, лимфома, рак кости, остеосаркома, хондросаркома, солидные опухоли с высоким уровнем микросателлитной нестабильности (MSI-H) или дефицитом репарации несоответствия (dMMR);

предпочтительно, стандартная доза антитела против TIGIT и/или биспецифического антитела против CTLA4/против PD-1 по любому из пп. 1-4 составляет 0,1-100 мг, предпочтительно 1-10 мг на кг массы тела; альтернативно, стандартная доза антитела против TIGIT по любому из пп. 1-4 и/или биспецифического антитела против CTLA4/против PD-1 по любому из пп. 1-4 составляет 10-1000 мг, предпочтительно 50-500 мг, 100-400 мг, 150-300 мг, 150-250 мг или 200 мг для каждого пациента;

предпочтительно дозу вводят от двух раз в день примерно до одного раза в день или один раз в 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 10 дней, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель или 6 недель;

предпочтительно путь введения представляет собой внутривенную капельную инфузию или внутривенную инъекцию.

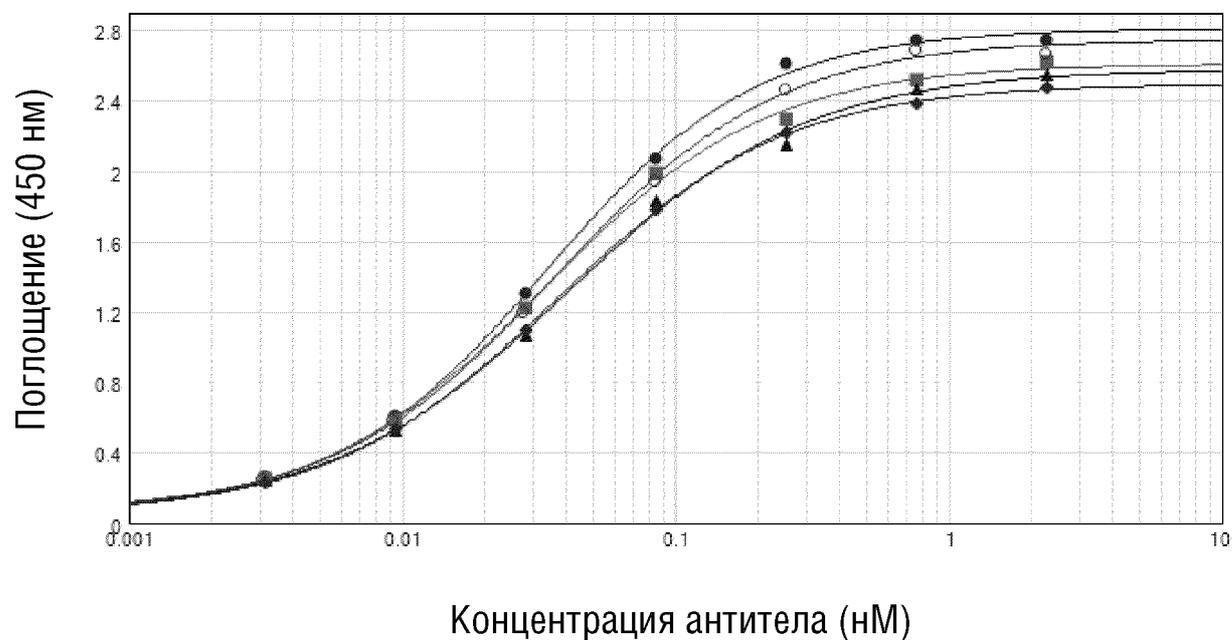
7. Стандартный состав, предпочтительно используемый для лечения опухоли, содержит: 1-10000 мг (предпочтительно 10-1000 мг, предпочтительно 50-500 мг, 100-400 мг, 150-300 мг, 150-250 мг или 200 мг) антитела против TIGIT по любому из пп. 1-4, 1-10000 мг (предпочтительно 1-1000 мг, предпочтительно 50-500 мг, 100-400 мг, 150-300 мг, 150-250 мг, 200 мг или 100 мг) биспецифического антитела против CTLA4/против PD-1 по

любому из пп. 1-4, и необязательно одно или более химиотерапевтических лекарственных средств (таких как лекарственное средство на основе платины и/или противоопухолевое лекарственное средство на основе фторурацила) по п.6, где антитело против TIGIT, биспецифическое антитело против CTLA4/против PD-1 и химиотерапевтическое лекарственное средство упакованы отдельно.

8. Однократная лекарственная форма, предпочтительно используемая для лечения опухоли, содержит: 0,1-10000 мг (предпочтительно 1-1000 мг, предпочтительно 50-500 мг, 100-400 мг, 150-300 мг, 150-250 мг, 200 мг или 100 мг) антитела против TIGIT по любому из пп. 1-4, и 0,1-10000 мг (предпочтительно 1-1000 мг, предпочтительно 50-500 мг, 100-400 мг, 150-300 мг, 150-250 мг, 200 мг или 100 мг) биспецифического антитела против CTLA4/против PD-1 по любому из пп. 1-4.

По доверенности

ФИГ.1



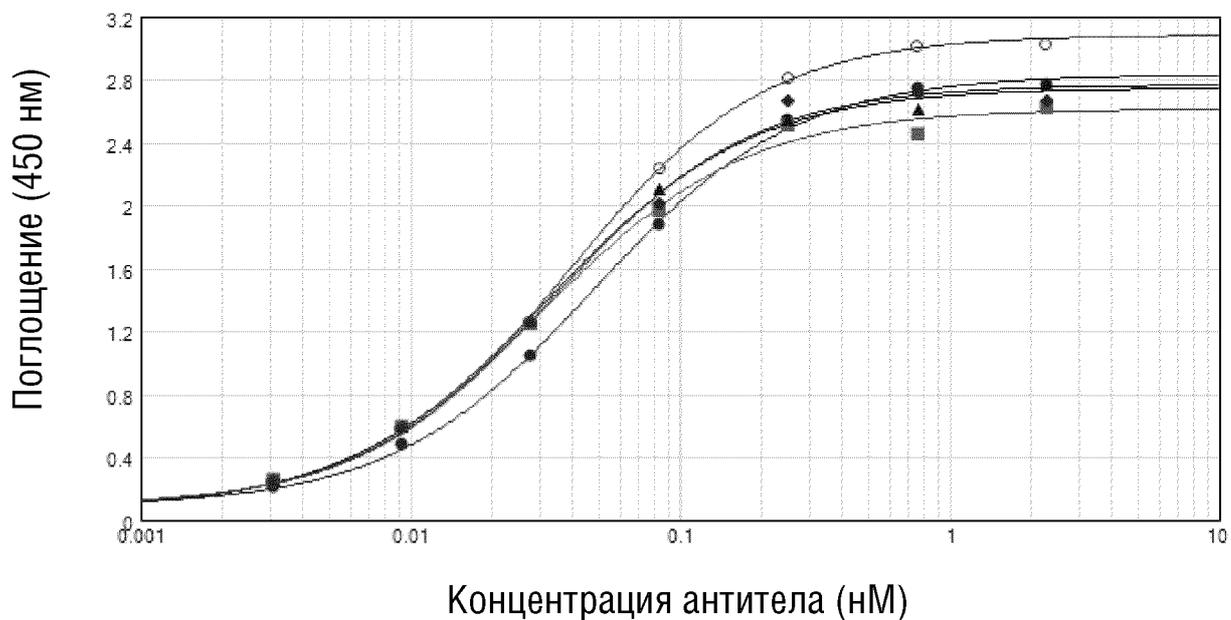
- 26B12H1L1
- 26B12H2L2
- ▲ 26B12H2L3
- ◆ 26B12H3L2
- RG6058

Аппроксимация кривой:
4-параметрическая

$$y = D + \frac{A - D}{1 + \left(\frac{x}{EC50}\right)^B}$$

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

ФИГ.2



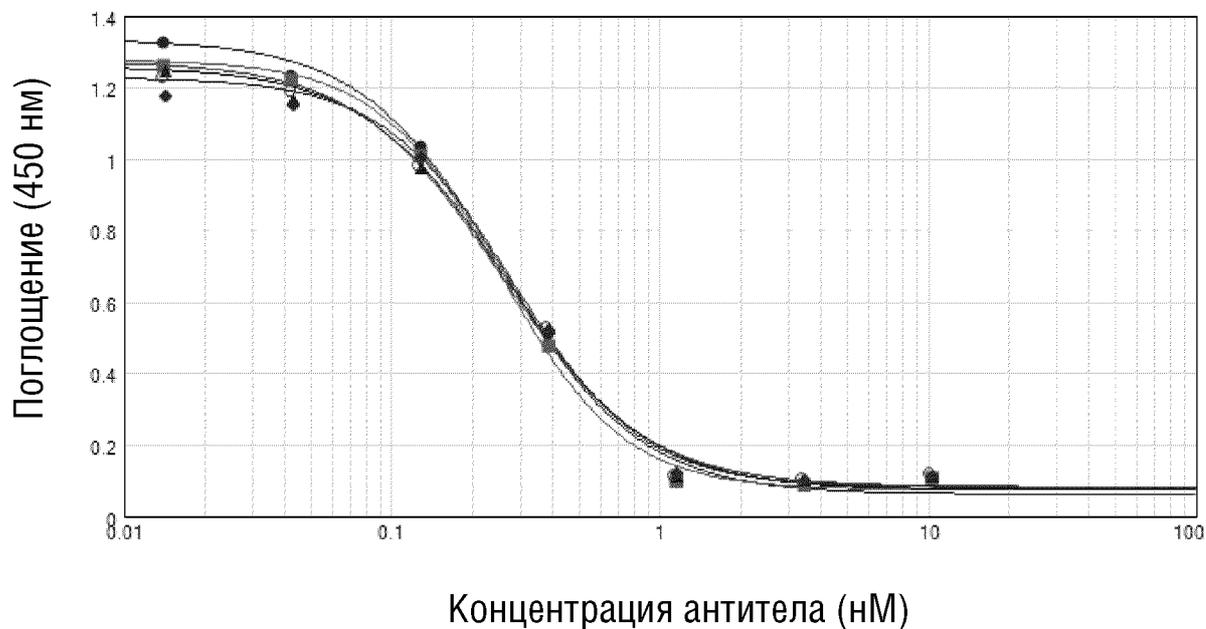
- 26B12H3L3
- 26B12H1L4
- ▲ 26B12H4L1
- ◆ 26B12H4L4
- RG6058

Аппроксимация кривой:
4-параметрическая

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

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

ФИГ.3

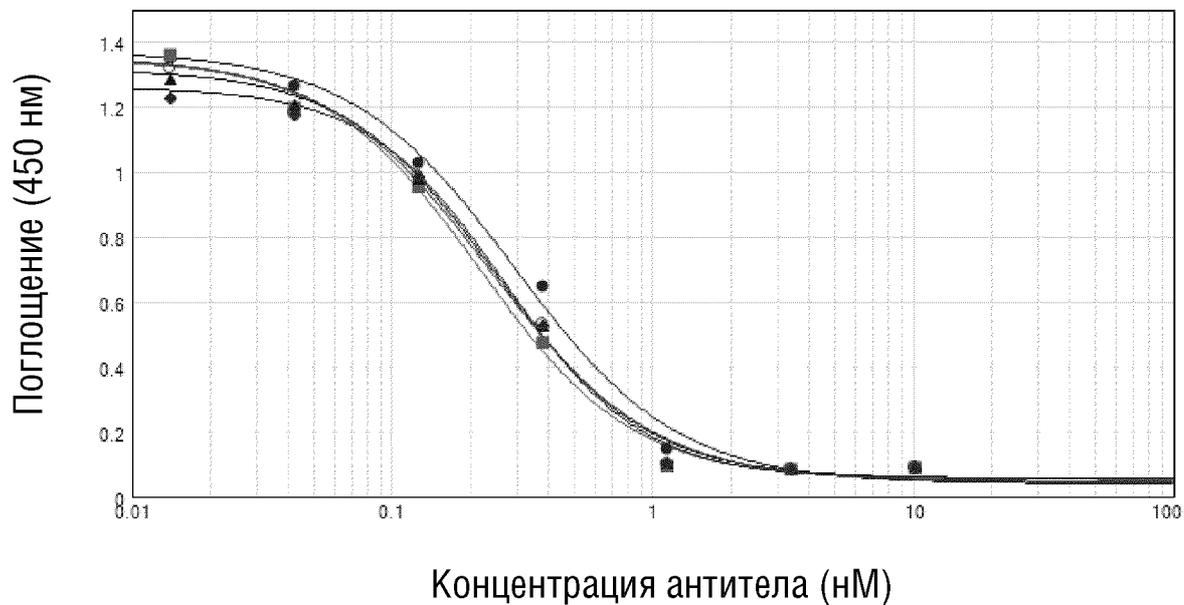


- 26B12H1L1
- 26B12H2L2
- ▲ 26B12H2L3
- ◆ 26B12H3L2
- RG6058

Аппроксимация кривой: $y = D + \frac{A - D}{1 + \left(\frac{x}{EC_{50}}\right)^{\bar{n}}}$
 4-параметрическая

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

ФИГ.4



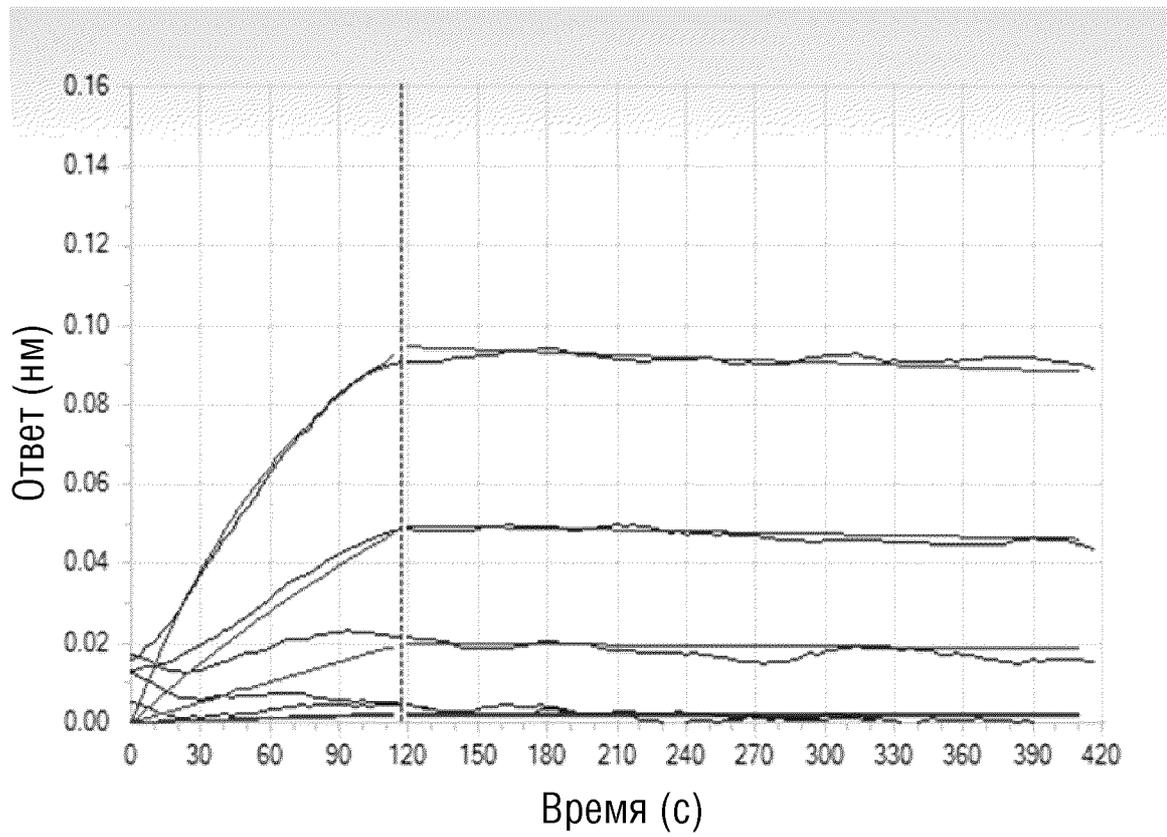
- 26B12H3L3
- 26B12H1L4
- ▲ 26B12H4L1
- ◆ 26B12H4L4
- RG6058

Аппроксимация кривой:
4-параметрическая

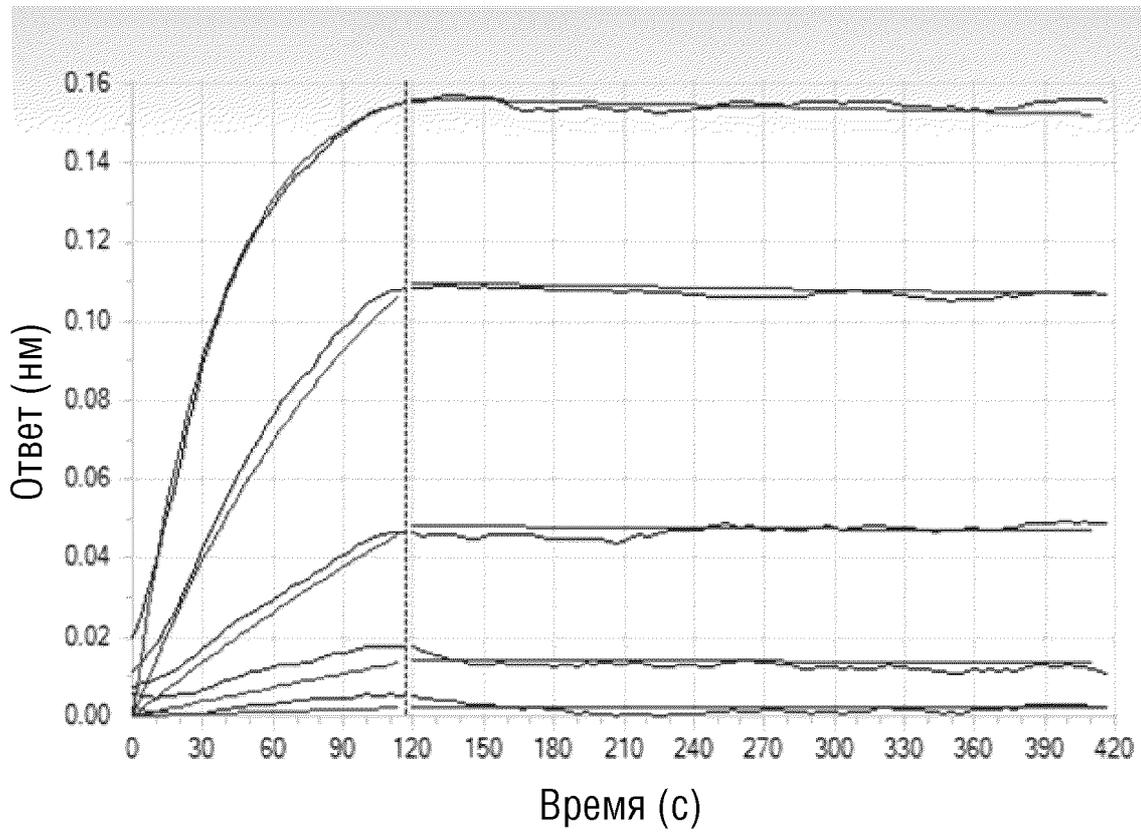
$$y = D + \frac{A - D}{1 + \left(\frac{x}{EC50}\right)^B}$$

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

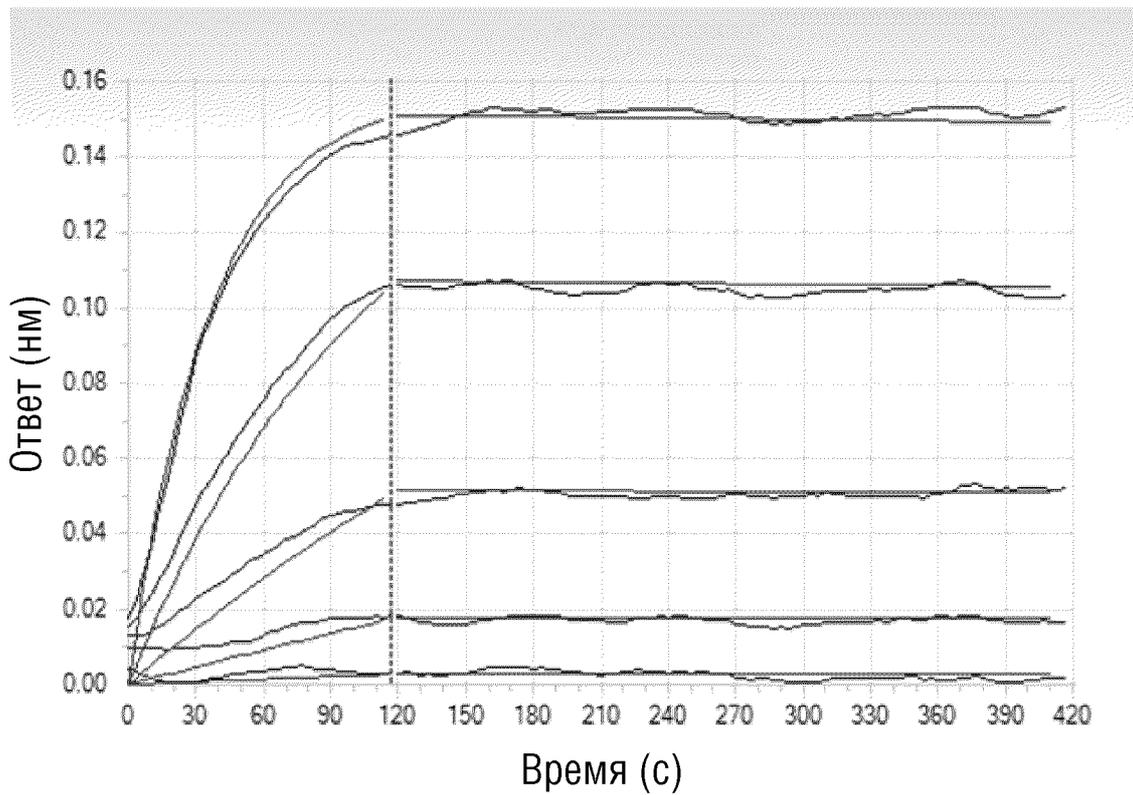
ФИГ.5



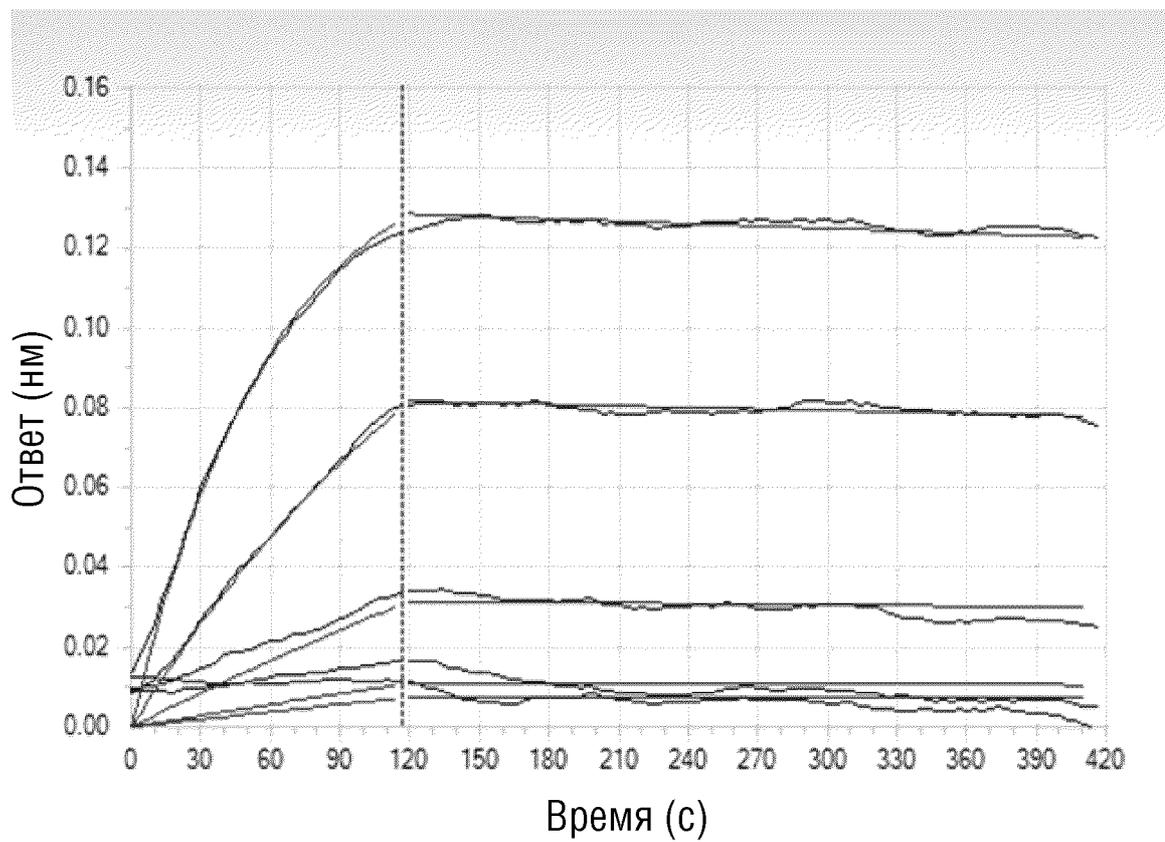
ФИГ.6



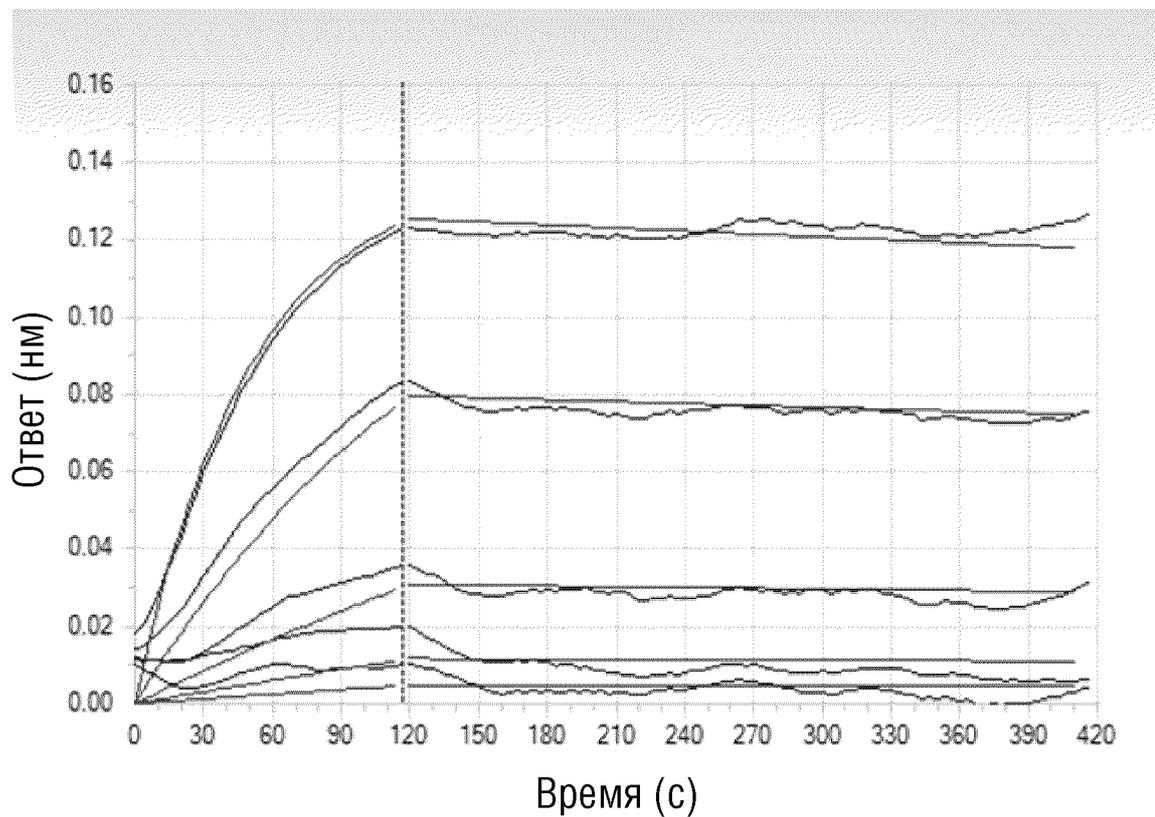
ФИГ.7



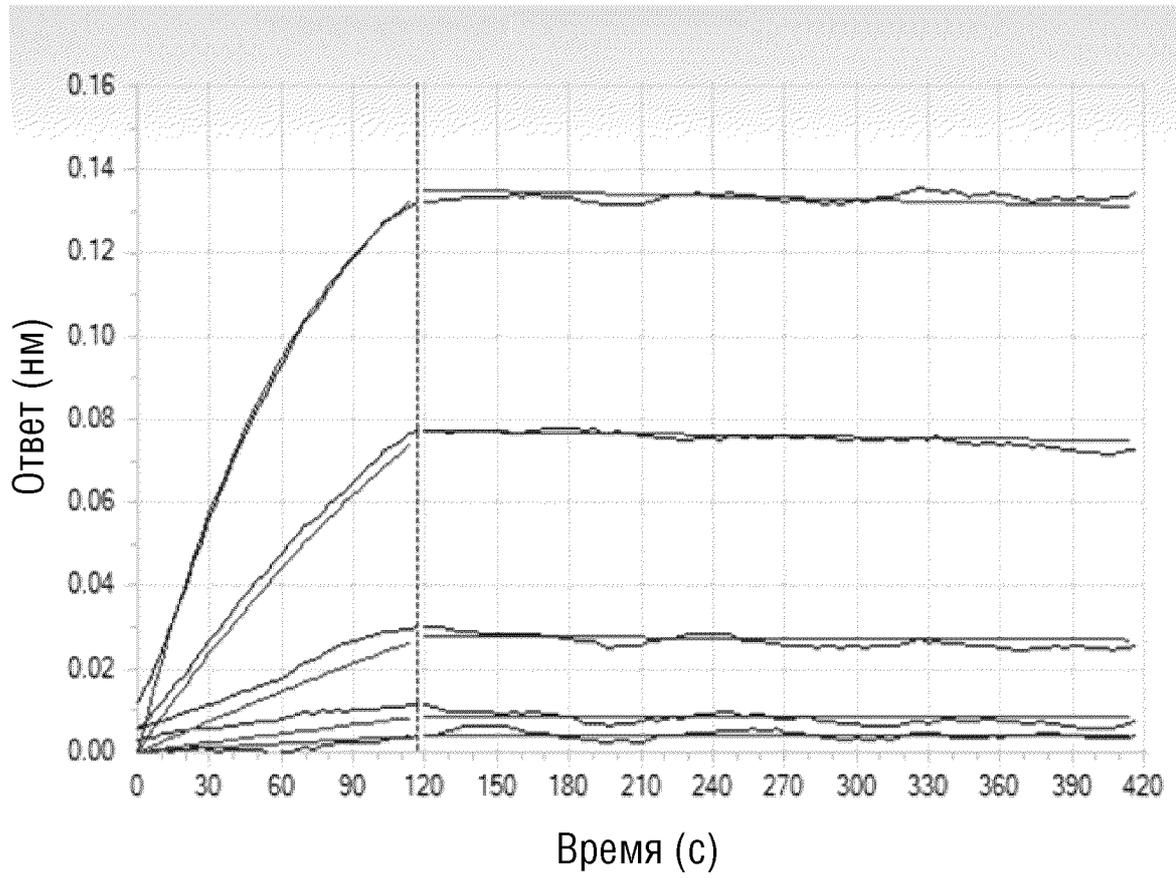
ФИГ.8



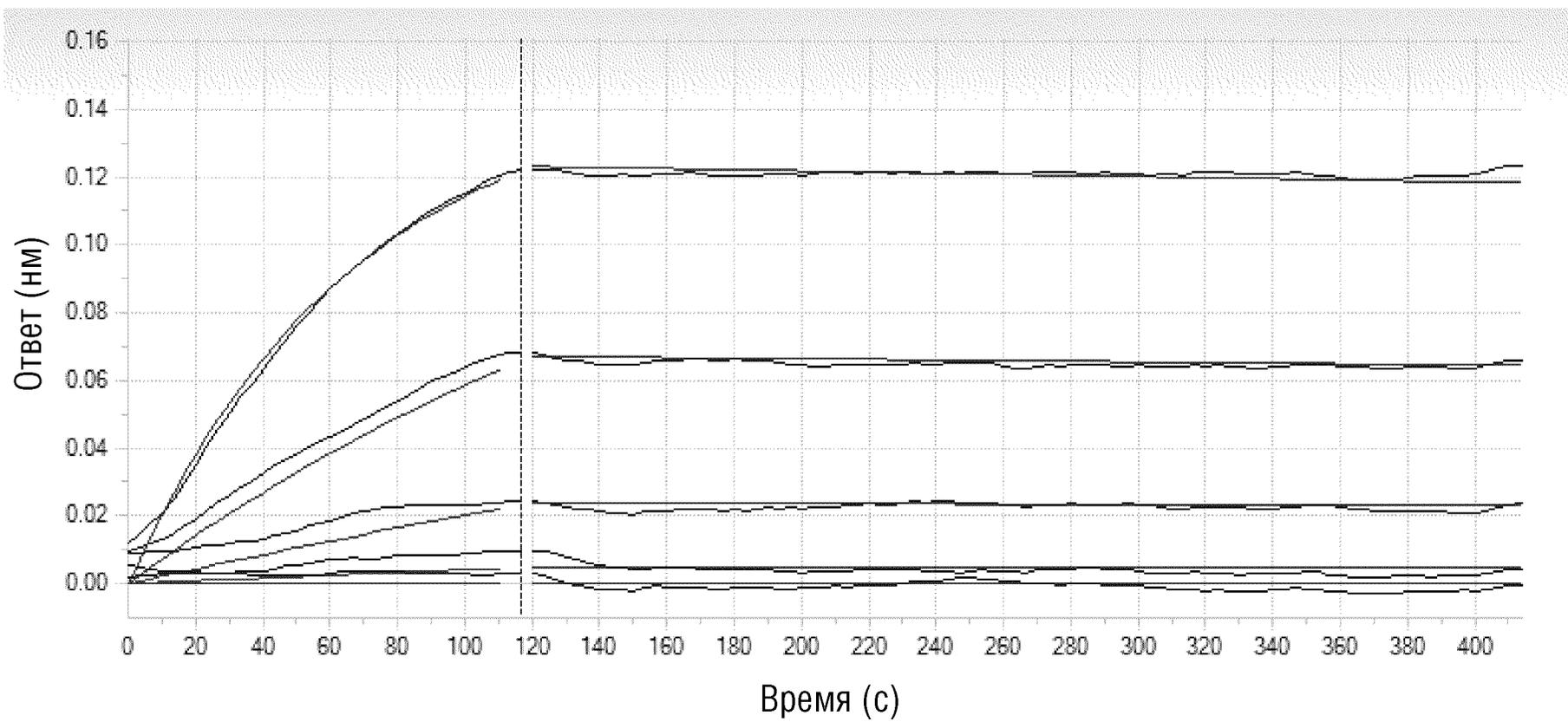
ФИГ.9



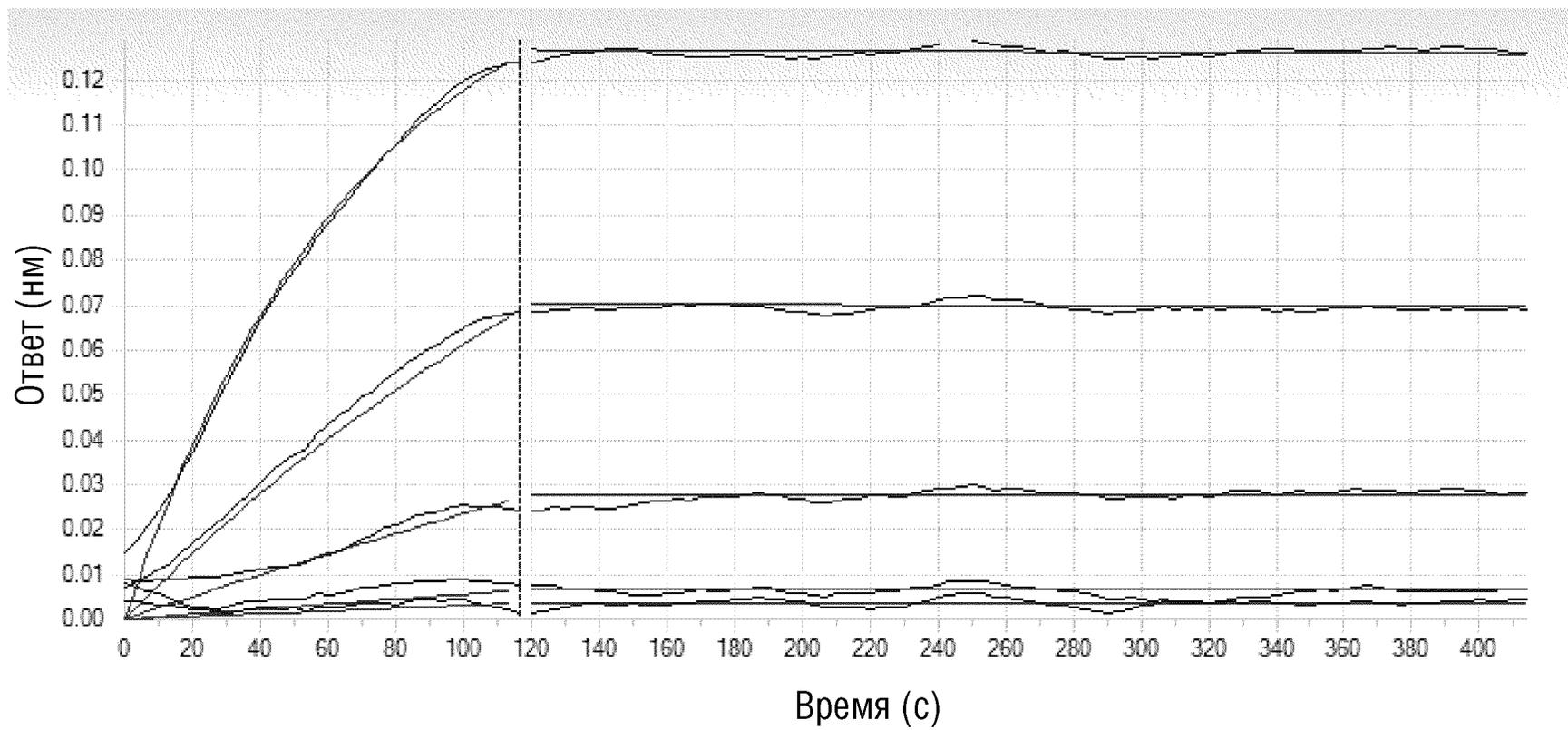
ФИГ.10



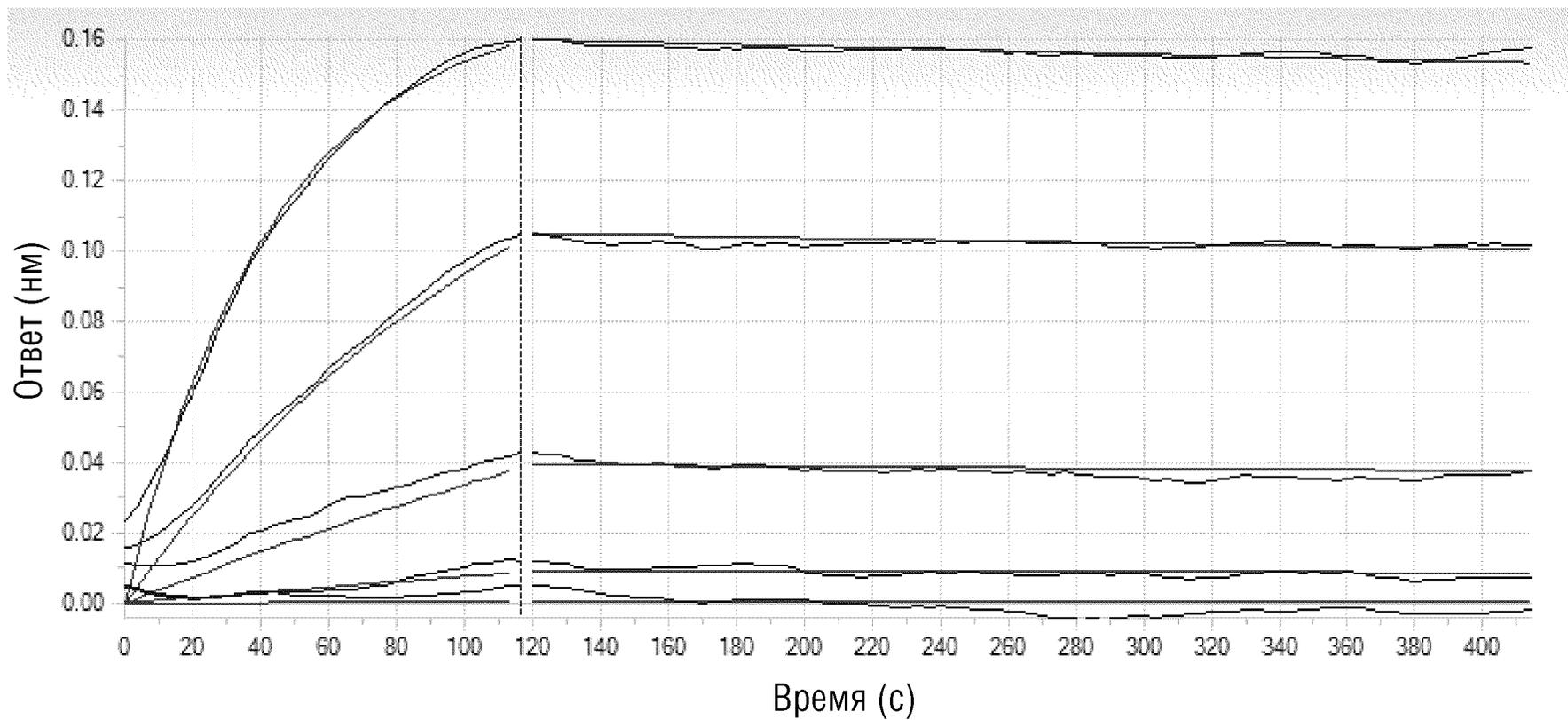
ФИГ.11



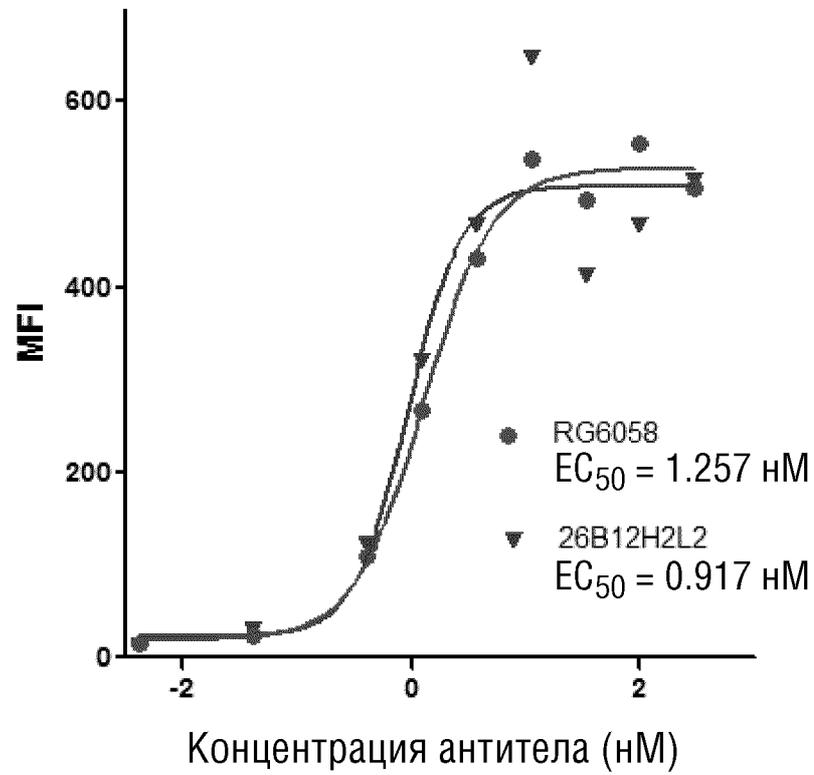
ФИГ.12



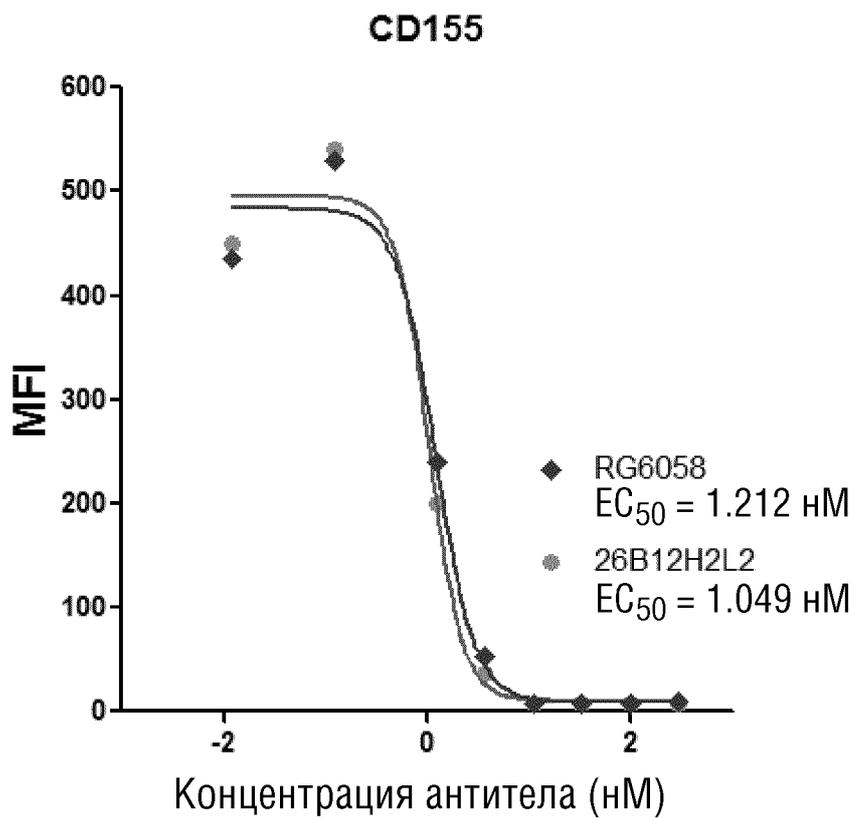
ФИГ.13



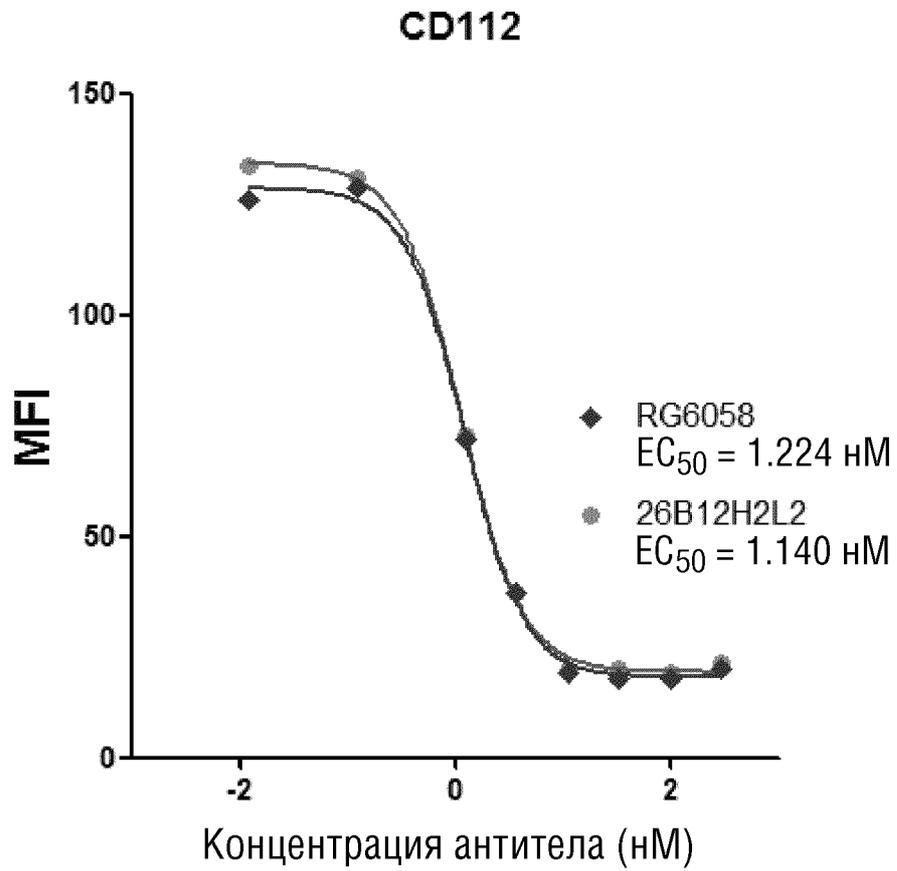
ФИГ.14



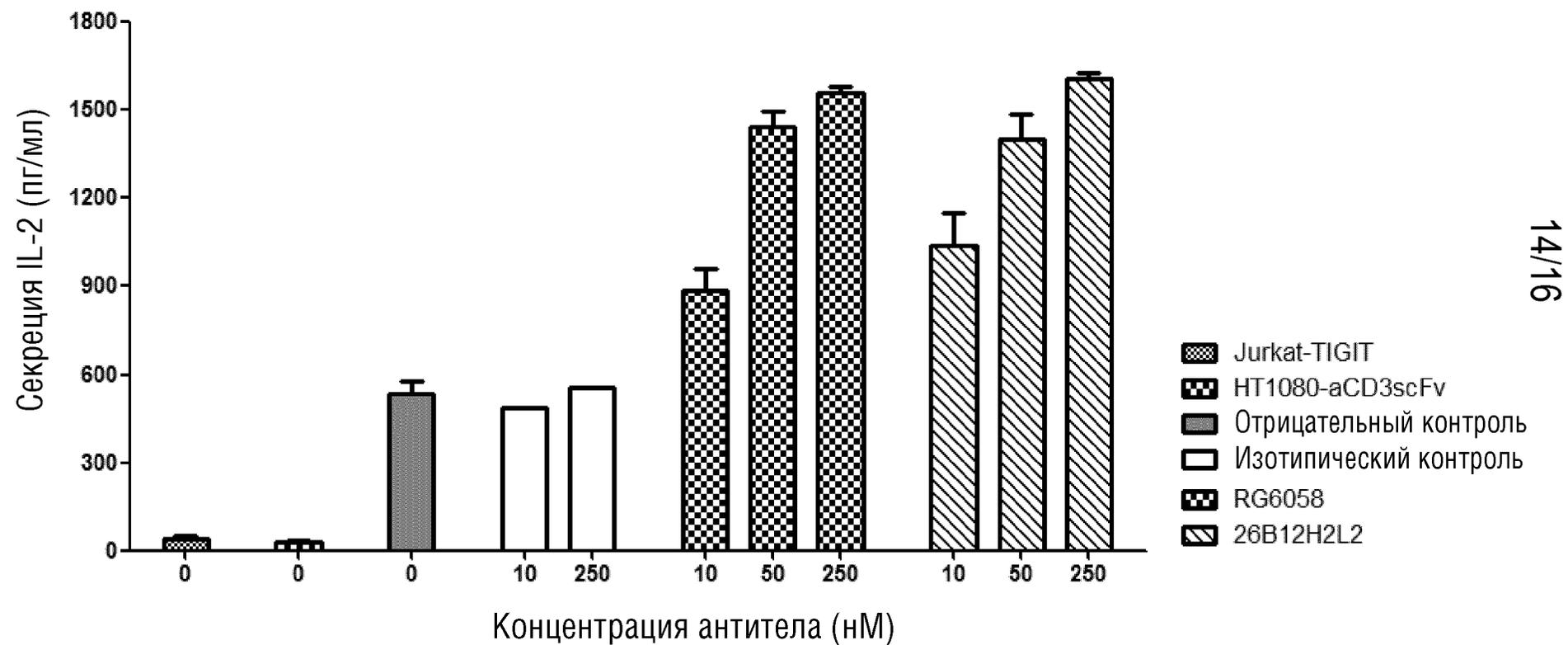
ФИГ.15



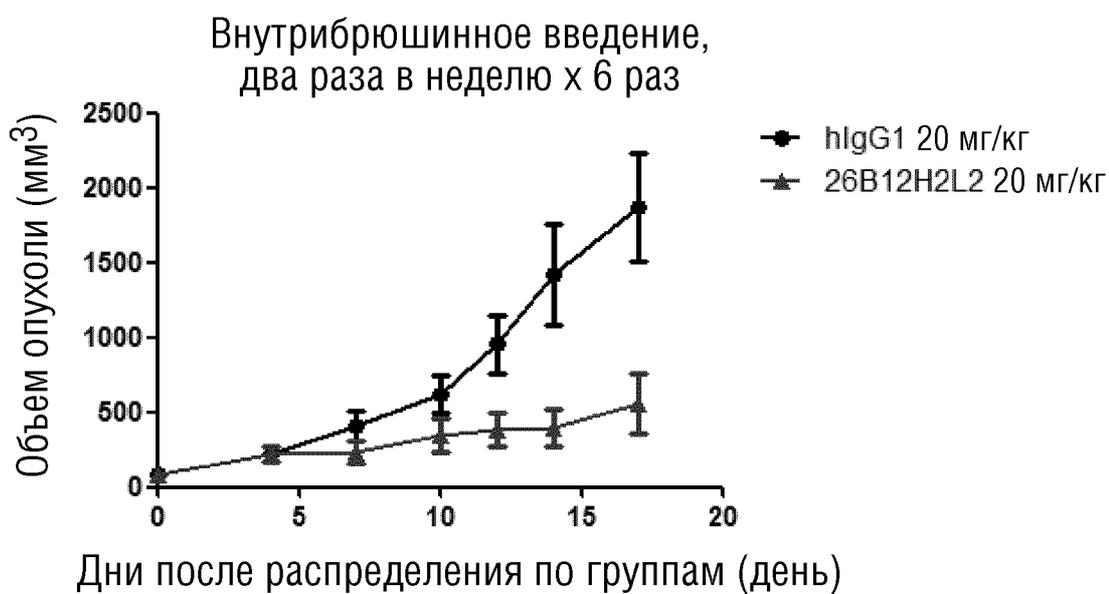
ФИГ.16



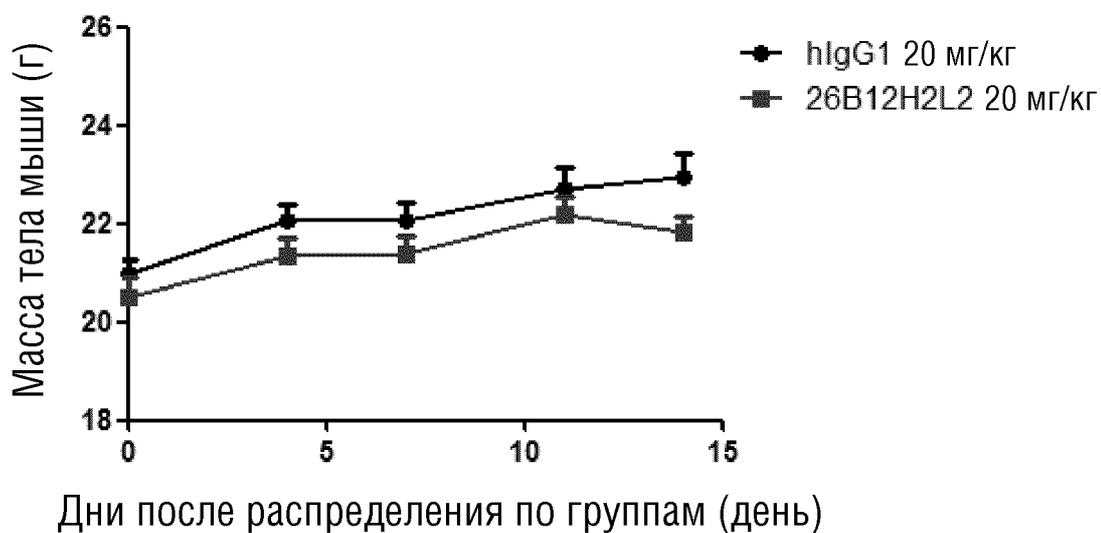
ФИГ.17



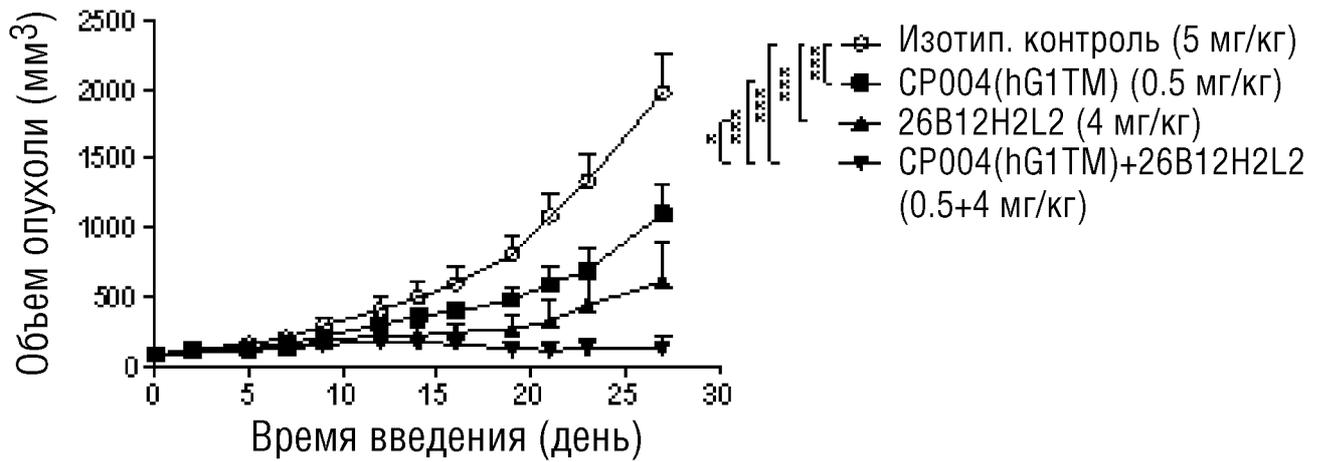
ФИГ.18



ФИГ.19



ФИГ.20



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$, двухфакторный ANOVA (поправка Бонферрони)

ФИГ.21

