

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **039219**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.12.20

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)

(21) Номер заявки
201791171

(22) Дата подачи заявки
2015.12.22

(54) АНТИТЕЛА К TIGIT

(31) **62/096,267**

(32) **2014.12.23**

(33) **US**

(43) **2017.11.30**

(86) **PCT/US2015/067332**

(87) **WO 2016/106302 2016.06.30**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**БРИСТОЛ-МАЙЕРС СКВИББ
КОМПАНИ (US)**

(72) Изобретатель:
**Морер Марк Ф., Чен Цен-Хуи Тимоти,
Дево Брижитт, Сринивасан Мохан,
Джюльен Сьюзан Х., Шеппард Пол О.,
Ардурел Дэниэл Ф., Чакраборти
Индрани (US)**

(74) Представитель:
**Угрюмов В.М., Лыу Т.Н., Глухарёва
А.О., Гизатуллина Е.М., Карпенко
О.Ю., Дементьев В.Н., Строкова О.В.
(RU)**

(56) **WO-A2-2009126688**

JOHNSTON ROBERT J. ET AL.: "The Immunoreceptor TIGIT Regulates Antitumor and Antiviral CD8+ T Cell Effector Function", CANCER CELL, CELL PRESS, US, vol. 26, no. 6, 26 November 2014 (2014-11-26), pages 923-937, XP029111576, ISSN: 1535-6108, DOI: 10.1016/J.CCELL.2014.10.018, abstract, page 927

LAETITIA COMPS-AGRAR ET AL.: "TIGIT mediated T cell exhaustion in cancer is dependent on TIGIT/CD226 interaction (TUM2P.907)", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 192, no. S1, 1 May 2014 (2014-05-01), XP055254520, the whole document

JOE-MARC CHAUVIN ET AL.: "TIGIT and PD-1 impair tumor antigen-specific CD8+ T cells in melanoma patients", JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 125, no. 5, 13 April 2015 (2015-04-13), pages 2046-2058, XP055254406, US, ISSN: 0021-9738, DOI: 10.1172/JCI80445, the whole document

T. INOZUME ET AL.: "Adaptive Immunity & Vaccination, ABSTRACTS Blockade for CD155-TIGIT interaction is an effective therapy for melanoma", ADAPTIVE IMMUNITY & VACCINATION, vol. 135, no. S1, 1 May 2015 (2015-05-01), XP055254532, the whole document
WO-A2-2015143343

(57) В изобретении предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с человеческим TIGIT (Т-клеточным иммунорецептором с доменами Ig и ITIM), а также использование этих антител или фрагментов в терапевтических применениях, таких как лечение злокачественной опухоли или хронической вирусной инфекции. Такой способ лечения предусматривает комбинированную терапию с ингибиторами других иммуномодулирующих рецепторных взаимодействий, таких как взаимодействие PD-1/PD-L1. Кроме того, в изобретении дополнительно предусмотрены полинуклеотиды, кодирующие переменную область тяжелой и/или легкой цепей антител, векторы экспрессии, содержащие полинуклеотиды, кодирующие переменную область тяжелой и/или легкой цепи антител, клетки, содержащие векторы, и способы получения антител или фрагментов посредством экспрессии их из клеток.

B1

039219

039219

B1

Предшествующий уровень техники изобретения

TIGIT (Т-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и ITIM) представляет собой коингибирующий рецепторный белок, также известный как WUCAM, Vstm3 или Vsig9. TIGIT был обнаружен при геномных поисках белков, специфически экспрессируемых на Т-клетках, и содержит варибельный домен иммуноглобулина, трансмембранный домен и иммунорецепторный основанный на тирозине ингибирующий мотив (ITIM), и содержит элементы сигнатурной последовательности семейства белков PVR. Известно, что он взаимодействует с рецептором полиовируса (PVR; CD155) и с нектином 2 (CD112). См., например, Stengel et al. (2012) Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA) 19:5399; публикации международной заявки WO 2006/124667; WO 2009/126688. Хотя PVR может взаимодействовать с коактивирующим рецептором DNAM-1 (CD226) для усиления уничтожения опухолей, высокоаффинное взаимодействие TIGIT/PVR будет препятствовать такому уничтожению и может предотвращать уничтожению нормальных (собственных) клеток, которые также экспрессируют PVR. Stanietzky et al. (2009) Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA) 106:17858. Преобладание этого ингибирующего взаимодействия может иметь важное значение для супрессии аутоиммунных реакций, но в контексте опухоли оно супрессирует ликвидацию опухоли.

TIGIT супрессирует активацию Т-клеток, способствуя производству зрелых иммунорегуляторных дендритных клеток. Yu et al. (2009) Nat. Immunol. 10:48. TIGIT и другие подобные коингибирующие молекулы (например, CTLA-4, PD-1, Lag3 и BTLA) могут играть роль в избегании опухолевыми клетками иммунного надзора. Эксперименты показали, что PVR/CD155 сверхэкспрессируется на клетках меланомы (Inozume et al. (2014) J. Invest. Dermatol. 134:S121 - реферат 693) и различных других опухолях. Возможно, что взаимодействие TIGIT/PVR может защищать такие опухолевые клетки от опосредованной иммунной системой ликвидации путем ингибирования противоопухолевых ответов Т- и НК-клеток. Stanietzky et al. (2009) Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA) 106:17858 и Lozano et al. (2012) J. Immunol. 188:3869. Другие эксперименты идентифицировали подмножество TIGIT⁺ регуляторных Т-клеток (T_{reg}), которые избирательно супрессируют ответы Th1 и Th17 (Joller et al. (2014) Immunity 40:569), предполагая альтернативный механизм, с помощью которого антитело к TIGIT может усиливать противоопухолевый иммунный ответ.

TIGIT может "отключать" иммунный ответ аналогично другим коингибирующим рецепторам, таким как CTLA-4, PD-1 и BTLA. Антитела, нацеленные на CTLA-4 (ипилимумаб) и PD-1 (ниволумаб, пембролизумаб), были одобрены для лечения злокачественных опухолей человека, подтверждая этот терапевтический подход. Антитела, которые связываются с человеческим TIGIT, также могут найти применение при лечении злокачественных опухолей. См., например, публикацию международной заявки WO 2006/124667. В мышинных моделях блокада антителами как PD-L1, так и TIGIT приводит к синергетическому усилению опосредованного CD8⁺ Т-клетками отторжения опухоли. Grogan et al. (2014) J. Immunol. 192(1) Suppl. 203.15; Johnston et al. (2014) Cancer Cell 26:1-15. Аналогичные результаты были получены на животных моделях меланомы. Inozume et al. (2014) J. Invest. Dermatol. 134:S121 - реферат 693. Некоторые эксперименты показывают, что блокада TIGIT эффективна для усиления противоопухолевого ответа CD8⁺ Т-клеток только в присутствии коактивирующего рецептора DNAM-1/CD226, который конкурирует с TIGIT за связывание с PVR/CD155, Johnston et al. (2014) Cancer Cell 26:1-15.

Недавние эксперименты показали, что внутриопухолевые бактерии, экспрессирующие белок Fap2, могут ингибировать опосредованное НК-клетками уничтожение опухоли путем связывания с TIGIT (Gur et al. (2015) Immunity 42:344), что указывает на то, что устранение таких бактерий, блокирующих взаимодействие TIGIT с Fap2 или блокирующих активность TIGIT, как правило, может быть полезным при лечении злокачественной опухоли, например злокачественной опухоли толстой и прямой кишок. Hampton (2015) JAMA 313:1305.

Существует потребность в улучшенных способах лечения злокачественной опухоли и хронических вирусных инфекций и таких лекарственных средствах, как терапевтические моноклональные антитела, для применения в способах. Лекарственные средства для применения в таких улучшенных способах лечения могут содержать антитела или фрагменты антител, которые специфически связываются с TIGIT и обращают или частично обращают опосредуемую TIGIT супрессию противоопухолевых или противовирусных иммунных реакций.

Краткое раскрытие изобретения

В изобретении предусмотрены улучшенные лекарственные средства и способы лечения злокачественной опухоли и хронической вирусной инфекции, предусматривающие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с huTIGIT. В настоящем документе предусмотрены выделенные антитела, такие как моноклональные антитела, в частности человеческие моноклональные антитела, которые специфически связываются с huTIGIT и обладают желаемыми функциональными свойствами, такими как высокоаффинное связывание с huTIGIT, связывание с TIGIT обезьяны (например, TIGIT яванского макака), способность блокировать связывание TIGIT с PVR и/или нектином-2, способность блокировать взаимодействие TIGIT с DNAM или любой комбинацией этих свойств.

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены усовершенствованные способы лечения злокачественной опухоли и терапевтические антитела для применения в способах, предусматривающих злокачественные опухоли, в которых опосредуемая TIGIT передача сигналов супрессирует противоопу-

холовый иммунный ответ, опухоли, в которых взаимодействие TIGIT с коактивирующим рецептором DNAM-1/CD226 супрессирует противоопухолевый иммунный ответ, опухоли, в которых экспрессирующие TIGIT регуляторные Т-клетки супрессируют противоопухолевый иммунный ответ, или опухоли, в которых TIGIT иным образом ингибирует противоопухолевый иммунный ответ. В настоящем изобретении также предусмотрены способы и терапевтические антитела для применения при лечении хронических вирусных инфекций, при которых TIGIT супрессирует противовирусный иммунный ответ.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к антителам, которые конкурируют с антителами, содержащими раскрытые в настоящем документе последовательности переменного домена тяжелой и легкой цепей для связывания с huTIGIT, и/или которые перекрестно блокируют антитела, содержащие раскрытые в настоящем документе последовательности переменного домена тяжелой и легкой цепей от связывания с huTIGIT.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела к TIGIT по настоящему изобретению или их антигенсвязывающие фрагменты усиливают противоопухолевый иммунный ответ, например антигенспецифический Т-клеточный ответ. Согласно другим вариантам осуществления антитела к TIGIT по настоящему изобретению или их антигенсвязывающие фрагменты блокируют опосредованную TIGIT ингибирующую сигнализацию, позволяющую костимуляцию PVR/DNAM NK-клеток для увеличения NK-опосредованного противоопухолевого уничтожения. Согласно еще одному варианту осуществления антитела к TIGIT по настоящему изобретению или их антигенсвязывающие фрагменты истощают популяцию регуляторных Т-клеток в опухоли, которая в противном случае супрессировала бы противоопухолевый иммунный ответ. Согласно еще одному варианту осуществления антитела к TIGIT по настоящему изобретению, с заданным форматом в виде IgG1, истощают CD8⁺ истощенные Т-клетки и T_{reg}, что позволяет приток свежих, неистощенных CD8⁺ Т-клеток. Согласно другим вариантам осуществления антитела к TIGIT по настоящему изобретению или их антигенсвязывающие фрагменты действуют по одному из нескольких перечисленных механизмов, поскольку механизмы не обязательно представляют собой взаимоисключающие.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела к TIGIT по настоящему изобретению или их антигенсвязывающие фрагменты не связываются с активирующими рецепторами Fcγ (FcγR), например, в вариантах осуществления, основанных на усилении противоопухолевой активности экспрессирующих TIGIT клеток. Согласно альтернативным вариантам осуществления антитела к TIGIT по настоящему изобретению или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с одним или несколькими активирующими FcγR, например, в вариантах осуществления, основанных на уничтожении экспрессирующих TIGIT клеток, таких как истощенные CD8⁺ Т-клетки или T_{reg}.

В настоящем изобретении также предусмотрены выделенные моноклональные антитела (15A6) или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с huTIGIT и содержат последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 14, 15 и 16, соответственно, и/или последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 17, 18 и 19 соответственно.

В настоящем изобретении также предусмотрены выделенные моноклональные антитела (22G2) или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с huTIGIT и содержат последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 20, 21 и 22 соответственно, и/или последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 23, 24 и 25 соответственно.

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены выделенные моноклональные антитела (11G11) или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с huTIGIT и содержат последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 26, 27 и 28 соответственно, и/или последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 29, 30 и 31 соответственно.

В настоящем изобретении еще предусмотрены выделенные моноклональные антитела (10D7) или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с huTIGIT и содержат последовательности CDRH1, CDRH2 и CDRH3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 32, 33 и 34 соответственно, и/или последовательности CDRL1, CDRL2 и CDRL3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 35, 36 и 37 соответственно.

В настоящем изобретении также предусмотрены выделенные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с huTIGIT и содержат последовательность переменной тяжелой цепи и переменной легкой цепи, раскрытые в SEQ ID NO: 2 (или 3, 4, 5) и 6; SEQ ID NO: 7 (или 8) и 9; SEQ ID NO: 10 и 11; и SEQ ID NO: 12 и 13.

В настоящем изобретении предусмотрены выделенные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с huTIGIT и содержат переменные области тяжелой и легкой цепей, причем переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90, 95 или 99% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10 и 12.

В настоящем изобретении также предусмотрены выделенные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с huTIGIT и содержат вариабельные области тяжелой и легкой цепей, причем вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90, 95 или 99% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 9, 11 и 13.

Согласно некоторым вариантам осуществления выделенные моноклональные антитела по настоящему изобретению или их антигенсвязывающие фрагменты (а) связываются с одним и тем же эпитопом на huTIGIT, таким как 15A6, 22G2, 11G11 и/или 10D7, и/или (b) ингибируют связывание 15A6, 22G2, 11G11 и/или 10D7 с huTIGIT, как измерено, например, с помощью FACS или ELISA.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела к huTIGIT по настоящему изобретению или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с эпитопом, содержащим или состоящим из одного или нескольких остатков E60, 1109, L65, N70, F107, T117, 168, H76 и N58 (антитело 22G2) huTIGIT (SEQ ID NO: 1) в эпитопе, содержащем или состоящем из одного или нескольких остатков G74, N70, H76, L65, L73, Q56, 168, H111 и P114 (антитело 11G11), или в эпитопе, содержащем или состоящем из одного или нескольких остатков H76, G74, L65, N58, 168, Q139, G135, L73, F107, N70, E60, H134, A132 и 1109 (антитело 15A6).

Альтернативно, антитела к huTIGIT по настоящему изобретению или их антигенсвязывающие фрагменты связываются с эпитопом, содержащим или состоящим из одной или нескольких последовательностей, выбранных из группы, состоящей из NWEQQDQLLAICNADLGWH (SEQ ID NO: 38) и FCIYHTYPDGT (SEQ ID NO: 39) (антитело 22G2), или из группы, состоящей из QVNWEQQDQLLAICNADLGWH (SEQ ID NO: 40) и HTYP (SEQ ID NO: 41) (антитело 11G11), или из группы, состоящей из NWEQQDQLLAICNADLGWH (SEQ ID NO: 38), FCI и AENGARFQ (SEQ ID NO: 43) (антитело 15A6).

Согласно еще одному варианту осуществления антитело к TIGIT по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом ядра на huTIGIT (SEQ ID NO: 1), содержащим или состоящим из одного или нескольких остатков L65, 168, N70 и H76, и/или с эпитопом, содержащим или состоящим из LLAICNADLGWH (SEQ ID NO: 44).

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела к huTIGIT по настоящему изобретению или их антигенсвязывающие фрагменты также связываются с TIGIT яванского макака.

Согласно различным вариантам осуществления антитела к TIGIT или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению представляют собой антитела IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека или их варианты. Согласно некоторым вариантам осуществления, включая в себя без ограничения, способы блокирования сигнализации TIGIT в "истощенных" опухолеспецифических Т-клетках или блокирования ингибирующих сигналов на NK-клетках, позволяющих опосредованную DNAM-1/PVR ко-стимуляцию, или способы блокирования взаимодействия TIGIT с DNAM-1/CD226 для нарушения гомодимеризации DNAM-1, антитела к TIGIT или их антигенсвязывающие фрагменты содержат лишённые эффекторных функций или в основном лишённые эффекторных функций Fc. Такие Fc-области включают в себя, например, человеческий IgG2 или IgG4, или лишённый эффекторных функций вариант человеческого IgG1 с одной или несколькими из следующими мутациями: L234A, L235E, G237A, A330S и P331S (нумерация EC), включая в себя IgG1. 1f (SEQ ID NO: 48), содержащий все пять перечисленных мутаций.

Согласно альтернативным вариантам осуществления, включая в себя без ограничения способы истощения регуляторных Т-клеток TIGIT⁺, антитела к TIGIT или их антигенсвязывающие фрагменты содержат Fc, который предпочтительно связывается с активирующим FcγR (FcγRI, FcγRIIa или FcγRIIIa), таким как человеческий IgG1, или вариантом последовательности, характеризующимся усиленным связыванием с активирующим FcγR относительно Fc IgG1 дикого типа. Согласно вариантам осуществления, предусматривающим применение форм антител IgG1 к TIGIT по настоящему изобретению для управления истощением T_{reg}, может быть необязательно применена внутриопухолевая инъекция для локализации эффектов к опухолевому микроокружению, минимизируя потенциальные побочные эффекты, вызванные активностью в периферических тканях.

Согласно некоторым вариантам осуществления остатки метионина в областях CDR антител к TIGIT по настоящему изобретению (например, M1 15 в CDRH3 10D7, SEQ ID NO: 34) или их антигенсвязывающих фрагментов заменены аминокислотными остатками, которые не подвергаются окислению.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела к huTIGIT, которые конкурируют за связывание, блокируют или связываются с тем же эпитопом, что и 15A6, 22G2, 11G11 или 10D7, или их антигенсвязывающие фрагменты, представляют собой человеческие или гуманизированные антитела.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела к huTIGIT по настоящему изобретению не представляют собой или не связываются с тем же эпитопом, что и антитела, описанные в публикации заявки на патент США № 2009/0258013, например, они не связываются с тем же эпитопом, что и моноклональное антитело к huTIGIT 10A7 или 1F4. См. также Johnston et al. (2014) Cancer Cell 26:1; Yu et al. (2009) Nat. Immunol. 10:48.

Согласно другим вариантам осуществления антитела к huTIGIT содержат вариабельные домены, происходящие из тех же самых последовательностей зародышевой линии V-домена человека, что и рас-

крытые в настоящем документе антитела, включая в себя V-домены V4-39, V4-61 или V1-69 тяжелой цепи. Согласно более конкретным вариантам осуществления антитела к huTIGIT содержат переменные домены тяжелой и легкой цепей, полученные из тех же самых последовательностей зародышевой линии V-домена тяжелой и легкой цепи человека, что и раскрытые в настоящем документе антитела, такие как V4-39/VA27 (15A6), V4-61/VL6 (22G2), V4-39/VL6 (11G11) и V1-69/VL15 (10D7).

Согласно различным вариантам осуществления антитела к huTIGIT по настоящему изобретению связываются с huTIGIT с K_D менее чем 10, 5, 2, 1 нМ, 300 или 100 пМ. Согласно другим вариантам осуществления антитела к huTIGIT по изобретению связываются с huTIGIT с K_D от 2 нМ до 100 пМ.

Согласно другим вариантам осуществления антитела к huTIGIT по настоящему изобретению состоят, по существу, из некоторой комбинации CDR антител 15A6, 22G2, 11G11 и 10D7, таких как CDRH1 (SEQ ID NO: 14, 20, 26 и 32); CDRH2 (SEQ ID NO: 15, 21, 27 и 33); CDRH3 (SEQ ID NO: 16, 22, 28 и 34); CDRL1 (SEQ ID NO: 17, 23, 29 и 35); CDRL2 (SEQ ID NO: 18, 24, 30 и 36) и CDRL3 (SEQ ID NO: 19, 25, 31 и 37) или содержат их. Согласно другим вариантам осуществления антитела по существу состоят из отдельных специфических комбинаций последовательностей CDR антител 15A6, 22G2, 11G11 и 10D7 или содержат их.

Согласно другим вариантам осуществления антитела к huTIGIT по настоящему изобретению по существу состоят из или содержат переменные домены тяжелой и/или легкой цепи антител 15A6 (SEQ ID NO: 2-5 и 6), 22G2 (SEQ ID NO: 7-8 и 9), 11G11 (SEQ ID NO: 10 и 11) и 10D7 (SEQ ID NO: 12 и 13), или последовательности, характеризующиеся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80, 85, 90 и 95% по отношению к этим раскрытым последовательностям.

Согласно еще одному варианту осуществления антитела к huTIGIT по настоящему изобретению, по существу, состоят из или содержат тяжелые и/или легкие цепи, содержащие последовательности переменного домена антител 15A6 (SEQ ID NO: 2-5 и 6), 22G2 (SEQ ID NO: 7-8 и 9), 11G11 (SEQ ID NO: 10 и 11) и 10D7 (SEQ ID NO: 12 и 13) или последовательности, характеризующиеся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80, 85, 90 и 95% по отношению к этим раскрытым последовательностям.

Согласно другим вариантам осуществления антигенсвязывающие домены антител по настоящему изобретению присутствуют в биспецифических молекулах, дополнительно содержащих антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с другим иммуномодулирующим рецептором, включая в себя без ограничения, PD-1, CTLA-4 или LAG-3.

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены нуклеиновые кислоты, кодирующие переменные области тяжелой и/или легкой цепей антител к huTIGIT по настоящему изобретению или их антигенсвязывающих фрагментов, экспрессирующие векторы, содержащие молекулы нуклеиновой кислоты, клетки, трансформированные экспрессирующими векторами, и способы получения антител путем экспрессии клеток, трансформированных экспрессирующими векторами, и выделения антител.

В настоящем изобретении также предусмотрены описанные в настоящем документе иммуноконъюгаты, содержащие антитела к huTIGIT, связанные со средством, таким как обнаруживаемая метка или цитотоксическое средство.

В настоящем изобретении также предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие антитела к huTIGIT по настоящему изобретению или их антигенсвязывающие фрагменты и носитель. Также в настоящем документе предусмотрены наборы, содержащие антитела к TIGIT или их антигенсвязывающие фрагменты и инструкции для применения.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предусмотрен способ усиления антигенспецифического T-клеточного ответа, предусматривающего контактирование T-клетки с антителом к huTIGIT по настоящему изобретению или его антигенсвязывающим фрагментом, так что антигенспецифический T-клеточный ответ усиливается, например, путем уменьшения ингибирующего сигнала, который в противном случае ослаблял бы противоопухолевый ответ. Согласно некоторым вариантам осуществления антигенспецифическая T-клетка представляет собой специфическую к опухолевому антигену эффекторную T-клетку, такую как CD8⁺ T-клетку, и усиление, например, путем блокирования опосредованного TIGIT ингибирующего эффекта, приводит к повышенной противоопухолевой активности. Антитела к huTIGIT по настоящему изобретению или их антигенсвязывающие фрагменты могут также снижать ингибирующие сигналы в NK-клетках и тем самым увеличивать их противоопухолевую активность. Без ограничения теорией антитела к huTIGIT по настоящему изобретению усиливают эффекторную функцию T-клеток или NK-клеток, блокируя связывание TIGIT с PVR, тем самым уменьшая или устраняя ингибирующий сигнал, который в противном случае был бы доставлен к клетке. Альтернативно или дополнительно, антитела к TIGIT по настоящему изобретению или их антигенсвязывающие фрагменты могут ингибировать взаимодействие между TIGIT и DNAM-1/CD226, которое в противном случае уменьшало бы опосредованную DNAM-1 иммунную активацию.

Кроме того, в настоящем изобретении дополнительно предусмотрен способ увеличения производства и/или пролиферации IL-2 и/или IFN- γ в T-клетке, предусматривающий контактирование T-клетки с эффективным количеством антитела к TIGIT или его антигенсвязывающего фрагмента.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предусмотрен способ уменьшения или исто-

щения T_{reg} в опухоли у нуждающегося в этом субъекта, предусматривающий введение эффективного количества антитела к huTIGIT по настоящему изобретению, причем антитело характеризуется эффекторной функцией или усиленной эффекторной функцией для уменьшения количества T_{reg} в опухоли.

В настоящем изобретении предусмотрен способ усиления иммунного ответа у субъекта, предусматривающий введение эффективного количества антитела к huTIGIT по настоящему изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента субъекту, так что иммунный ответ субъекта усиливается. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект характеризуется наличием опухоли, и иммунный ответ против опухоли усиливается. Согласно другому варианту осуществления субъект характеризуется наличием вирусной инфекции и противовирусный иммунный ответ усиливается.

В настоящем изобретении также предусмотрен способ ингибирования роста опухолей у субъекта, предусматривающий введение субъекту антитела к huTIGIT по настоящему изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента, так что рост опухоли ингибируется.

Кроме того, в настоящем изобретении дополнительно предусмотрен способ лечения злокачественной опухоли, например, путем иммунотерапии, предусматривающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества антитела к huTIGIT по настоящему изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента, например, в качестве фармацевтической композиции, тем самым подвергая лечению злокачественную опухоль. Согласно некоторым вариантам осуществления злокачественная опухоль представляет собой злокачественную опухоль мочевого пузыря, злокачественную опухоль молочной железы, злокачественную опухоль матки/шейки матки, злокачественную опухоль яичников, злокачественную опухоль предстательной железы, злокачественную опухоль семенника, злокачественную опухоль пищевода, злокачественную опухоль желудочно-кишечного тракта, злокачественную опухоль поджелудочной железы, злокачественную опухоль толстой и прямой кишок, злокачественную опухоль толстой кишки, злокачественную опухоль почек, злокачественную опухоль головы и шеи, злокачественную опухоль легкого, злокачественную опухоль желудка, герминогенную злокачественную опухоль, злокачественную опухоль кости, злокачественную опухоль печени, злокачественную опухоль щитовидной железы, злокачественную опухоль кожи, новообразование центральной нервной системы, лимфому, лейкоз, миелому, саркому и связанную с вирусом злокачественную опухоль. Согласно некоторым вариантам осуществления злокачественная опухоль представляет собой метастатическую злокачественную опухоль, рефрактерную злокачественную опухоль или рецидивирующую злокачественную опухоль.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе способы модуляции иммунной функции и способы лечения предусматривают введение антитела к huTIGIT по настоящему изобретению в сочетании с биспецифическим реагентом с одним или несколькими дополнительными лекарственными средствами, например антителом к PD-1, антителом к PD-L1, антителом к LAG3, антителом к GITR, антителом к OX40, антителом к CD73, антителом к CD40, моноклональным антителом к CD137, моноклональным антителом к CD27, антителом к CSF-1R и/или антителом к CTLA-4, агонистом TLR или низкомолекулярным антагонистом IDO или TGF(3). Согласно конкретным вариантам осуществления анти-huTIGIT терапия сочетается с анти-PD-1 и/или анти-PD-L1 терапией, например лечением антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, который связывается с PD-1 человека, или антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, который связывается с PD-L1 человека.

Согласно некоторым вариантам осуществления образцы от пациентов, например, биопсии, подвергаются скринингу на экспрессию DNAM-1 на Т-клетках или NK-клетках, чтобы выбрать пациентов, которые более вероятно будут отвечать на анти-TIGIT терапию, причем наличие DNAM-1 на Т-клетках предполагает, что у пациента будет благоприятный противоопухолевый ответ на анти-TIGIT терапию, например лечение антителом или фрагментом к huTIGIT по настоящему изобретению, а отсутствие DNAM-1 идентифицирует пациентов, которые с меньшей вероятностью получают пользу от анти-TIGIT терапии. Согласно другим вариантам осуществления образцы от пациентов подвергаются скринингу на экспрессию PVR и/или нектин-2 на опухолевых клетках или инфильтрирующих опухоль миелоидных клетках, чтобы выбрать пациентов, которые наиболее вероятно будут отвечать на анти-TIGIT терапию, причем наличие PVR и/или нектин-2 предполагает, что у пациента будет благоприятный противоопухолевый ответ при анти-TIGIT терапии, например лечение антителом или фрагментом к huTIGIT по настоящему изобретению, а отсутствие PVR и/или нектин-2/CD112 идентифицирует пациентов, которые с меньшей вероятностью получают пользу от анти-TIGIT терапии.

Согласно различным вариантам осуществления экспрессия на клеточной поверхности TIGIT, DNAM, PVR и/или нектин-2 определяется посредством FACS, ИНС или ЖХ-МС. Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предусмотрены способы лечения нуждающихся в этом субъектов, предусматривающие определение экспрессии TIGIT, DNAM, PVR и/или нектин-2 на клеточной поверхности, как описано в настоящем документе, и введение антител к TIGIT по настоящему изобретению преимущественно или исключительно тем, кому они более вероятно будут приносить терапевтическую пользу.

Согласно одному варианту осуществления содержание растворимого PVR и/или растворимого нектин-2 (sPVR, sNectin-2) измеряется у субъектов, рассматриваемых для лечения антителами к TIGIT по

настоящему изобретению, и только субъекты, проявляющие повышенное содержание растворимых PVR и/или нектин-2 подвергаются лечению антителами. Согласно некоторым вариантам осуществления sPVR и/или sNectin-2 обнаруживают в сыворотке с помощью ИФА или ЖХ-МС.

В настоящем изобретении также предусмотрены способы обнаружения наличия TIGIT в образце, на клетке внутри образца (например, FACS) или в определенных местах в клетке или ткани (например, ИНС), или сортировки клеток на основании наличия или отсутствия TIGIT на их поверхности (например, FACS), предусматривающие контактирование образца с антителом к huTIGIT по настоящему изобретению или его антигенсвязывающим фрагментом в условиях, которые позволяют образовывать комплекс между антителом или его антигенсвязывающим фрагментом и TIGIT, и обнаружение образования комплекса. Согласно некоторым вариантам осуществления используемое для обнаружения антитело к TIGIT конъюгируют с обнаруживаемой меткой.

Другие особенности и преимущества настоящего раскрытия будут очевидны из следующего ниже подробного описания и примеров, которые не должны рассматриваться как ограничивающие.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показана принципиальная схема экспериментов "сортировки", в которых различные антитела к huTIGIT по настоящему изобретению исследуются попарно на способность блокировать связывание других антител с huTIGIT. Результаты показывают, что антитела попадают в ограниченное число категорий или "групп". См. пример 3;

на фиг. 2A, 2B и 2C - данные дрожжевого дисплея для связывания вариантов последовательности huTIGIT с антителами 22G2, 11G11 и 15A6 соответственно. Числа остатков для каждого аминокислотного остатка в зрелом huTIGIT представлены по оси абсцисс. Число остатков составляет на 21 меньше, чем нумерация для SEQ ID NO: 1, поскольку список последовательностей включает в себя сигнальный пептид, который не включен в фигуры. Как подробно описано в примере 4, варианты последовательностей дрожжей huTIGIT были выбраны на основании их неспособности связываться с соответствующими антителами (22G2, 11G11, 15A6). Соответственно, положения вдоль последовательности huTIGIT, которые характеризуются решающим значением для связывания антител, появляются с высокой частотой (т.е. в виде столбиков/линий, поднимающихся выше ординаты) из-за их избыточного представления в пуле несвязывающих клонов дрожжей. Частоты, с которыми появляются вариантные (не дикого типа) остатки у каждого остатка, представлены (на логарифмической шкале) по оси ординат, с одним столбиком (линией) или каждым остатком. Частотные данные нормируют к частотам, с которыми вариантные остатки появляются в каждом положении в невыбранной библиотеке, т.е. в библиотеках, которые не были подвергнуты селекции на основании невозможности связываться с антителами к huTIGIT по настоящему изобретению. См. пример 4;

на фиг. 3 - влияние моноклонального антитела 22G2 к TIGIT на лизис, выраженный в виде процента специфического лизиса клеток, экспрессирующих PVR человека НК-клетками человека. См. пример 5. Для каждого антитела левый столбик представляет собой клетки P815 дикого типа, а правый столбик представляет собой клетки P815, экспрессирующие PVR человека;

на фиг. 4A показано, что воздействие здоровой донорской крови человека с коктейлем антигенных пептидов (CETF = пептиды из ЦМВ, EBV, гриппа и столбняка) индуцирует повышенную экспрессию PD-1 и TIGIT на CD8⁺ Т-клетках. Образец "Без стим." не обрабатывался CETF, тогда как образец "Стим." подвергался воздействию. На фиг. 4B показано влияние моноклонального антитела к TIGIT и/или моноклонального антитела к PD-1 на экспрессию IFN γ из образцов крови четырех здоровых доноров-людей, подвергнутых стимуляции CETF. См. пример 6;

на фиг. 5A и 5B - эффекты антител к TIGIT, отдельно или в комбинации с другой иммуномодулирующей терапией, на рост опухоли на мышинной модели. На фиг. 5A показан объем опухоли (в кубических миллиметрах), рассчитанный путем умножения квадрата ширины опухоли на половину длины, на модели злокачественной опухоли толстой кишки CT26 мыши для мышей, обработанных антителом к мышинному TIGIT, характеризующемуся эффекторной функцией, которая делает возможным наличие мышинового домена Fc IgG2a ("TIGIT G2a"), антителом к мышинному TIGIT, характеризующемуся эффекторной функцией дефицитного домена Fc D265A IgG1 ("TIGIT G1 D265A"), антителом к мышинному PD-1, характеризующемуся эффекторной функцией домена Fc D265A IgG1 ("PD-1 G1 D265A"), их комбинацией или контрольным антителом IgG1. На фиг. 5B показаны эффекты анти-TIGIT монотерапии, а также комбинированной терапии антителами к PD-1 и антителами к CTLA-4. Объемы опухолей предоставляются вместе с количеством мышей без опухолей (TF) в каждой группе из десяти мышей в конце эксперимента. Каждая линия представляет собой одну мышь. После воздействия изотипическим контролем mIgG1 не было мышей без опухоли, как и после воздействия анти-TIGIT в качестве монотерапии. После воздействия анти-PD-1 в качестве монотерапии наблюдалась одна безопухолевая мышь и пять - при комбинации с анти-TIGIT. После воздействия анти-CTLA-4 в качестве монотерапии наблюдалось три мышши без опухолей и шесть - при комбинации с анти-TIGIT. См. пример 7;

на фиг. 6A и 6B - повышенная экспрессия PVR в злокачественных тканях. На фиг. 6A показана экспрессия мРНК PVR в различных типах опухолей, как обнаружено в наборах данных Атласа генома злокачественных опухолей (TCGA). Данные представлены для аденокарциномы (ACC), хро-

мофобной карциномы почек (KICH), гепатоцеллюлярной карциномы печени (LIHC), аденокарциномы толстой кишки и прямой кишки (COAD, READ), аденокарциномы поджелудочной железы (PAAD), феохромоцитомы и параганглиомы (PCPG), папиллярной карциномы почек (KJRP), аденокарциномы легких (LUAD), плоскоклеточной карциномы головы и шеи (HNSC), аденокарциномы предстательной железы (PRAD), карциномы эндометрия матки (UCEC), злокачественной опухоли шейки матки (CESC), кожной меланомы (SKCM), мезотелиомы (MESO), злокачественной опухоли мочевого пузыря (BLCA), светлоклеточной аденокарциномы (KIRC), плоскоклеточной карциномы легкого (LUSC), карциносаркомы матки (UCS), саркомы (SARC), серозной цистаденокарциномы яичника (OV), папиллярной карциномы щитовидной железы (THCA), мультиформной глиобластомы (GBM), злокачественной опухоли молочной железы (BRCA), низкодифференцированной глиомы (LGG) и диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBC). Результаты, раскрытые в настоящем документе, полностью или частично основаны на данных, созданных Исследовательской сетью TCGA. На фиг. 6B показан человеческий PVR в ткани аденокарциномы толстой кишки в сравнении с обычным эпителием толстой кишки, причем более темные области в образце аденокарциномы указывают на повышенную экспрессию PVR. См. пример 9;

на фиг. 7 - связывание рецептора Fc γ , выраженное в процентах от теоретического максимального значения связывания рецептора (R_{max}), для моноклонального антитела 2G2 к TIGIT, представленного в форме IgG1f (SEQ ID NO: 45) или IgG1.1f (SEQ ID NO: 48). Данные представлены для шести различных рецепторов Fc γ для двух разных партий антитела IgG1.1f, используемых в дозе 10 и 1 мкМ, как указано. В каждом кластере столбиков данные для рецепторов Fc γ представлены в порядке слева направо: hCD64 (Fc γ RI); hCD32a-H131 (Fc γ RIIA-H131); hCD32a-R131 (Fc γ RIIA-R131); hCD32b (Fc γ RIIB); hCD16a-V158 (Fc γ RIIA-V158) и hCD16b-NA2 (Fc γ RIIB-NA2, где NA2 обозначает аллотипический вариант). Хотя пары рецепторов Fc γ представлены одинаковыми столбиками, их идентичности ясны из того порядка, в котором они представлены. Аналогичное снижение наблюдалось при связывании с CD64, CD32a, CD32b и CD16 (не показано) рецепторов Fc γ яванского макака.

Подробное описание изобретения

В настоящем изобретении раскрыты выделенные антитела, в частности моноклональные антитела, например моноклональные антитела человека, которые специфически связываются с человеческим TIGIT ("huTIGIT") и блокируют связывание с PVR/CD155, тем самым уменьшая или устраняя иммуносупрессивный сигнал, который в противном случае возникал бы в экспрессирующих TIGIT клетках. В настоящем изобретении также предусмотрены выделенные антитела, в частности моноклональные антитела, например человеческие или гуманизированные моноклональные антитела, которые специфически связываются с человеческим TIGIT и блокируют взаимодействие человеческого TIGIT с DNAM-1/CD226, которое в противном случае предотвращало бы гомодимеризацию DNAM-1 и, таким образом, опосредованную DNAM-1 костимуляцию. Предусмотрены последовательности для различных человеческих моноклональных антител к huTIGIT. Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе антитела получают из конкретных последовательностей тяжелой и легкой цепей зародышевой линии, и/или они содержат конкретные структурные особенности, такие как области CDR, содержащие определенные аминокислотные последовательности.

Дополнительно предусмотрены способы получения таких антител, иммуноконъюгатов и биспецифических молекул, содержащих такие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, и фармацевтических композиций, составленных для содержания антител или фрагментов. Также в настоящем документе предусмотрены способы применения антител для усиления иммунного ответа, отдельно или в комбинации с другими иммуностимулирующими средствами (например, антителами), и/или способов лечения злокачественных опухолей или инфекций. Соответственно, описанные в настоящем документе антитела к huTIGIT могут быть использованы при лечении в широком спектре терапевтических применений, включая в себя, например, ингибирование роста опухолей и лечение хронических вирусных инфекций.

Определения.

Для того чтобы настоящее описание могло быть более понятным, сначала определяются определенные термины. Дополнительные определения излагаются во всем подробном описании.

TIGIT относится к "Т-клеточному иммунорецептору с доменами Ig и ITIM", представителю семейства PVR (полиовирусного рецептора) иммуноглобулиновых белков, который связывается с PVR/CD155 и нектином-2/CD112. TIGIT также упоминается как TIGIT, WUCAM, Vstm3 и Vsig9. Если не указано иное или не ясно из контекста, ссылки на TIGIT в настоящем документе относятся к человеческому TIGIT ("huTIGIT"), а антитела к TIGIT относятся к антителам к человеческому TIGIT. Человеческий TIGIT дополнительно описан в GENE ID NO: 201633 и MIM (Каталоге фенетических маркеров у человека): 612859. Последовательность человеческого TIGIT (NP776160.2), включая в себя 21 аминокислотную сигнальную последовательность, приведена в SEQ ID NO: 1. Если не указано иное или не ясно из контекста, "ингибирование" TIGIT относится к блокированию связывания и передачи сигналов PVR. Антитела к TIGIT по настоящему изобретению могут действовать посредством ингибирования передачи сигналов TIGIT, блокады взаимодействия TIGIT/DNAM-1 и/или других механизмов, таких как направление

истощения регуляторных Т-клеток.

PVR (рецептор полиовируса) взаимодействует с TIGIT для индуцирования иммуносупрессивного сигнала. PVR также упоминается как PVS; HVED; CD155; NECL5; TAGE4; Necl-5. Если не указано иное или не ясно из контекста, ссылки на PVR/CD155 в настоящем документе относятся к человеческому PVR ("huPVR"). Человеческий PVR дополнительно описан в GENE ID NO: 5817 и MIM: 173850.

Существуют четыре известных варианта транскрипта человеческого PVR: α (NP_006496.4), β (NP_001129240.1), γ (NP_001129241.1) и δ (NP_001129242.2), последовательности которого приведены в SEQ ID NO: 50-53. Если не указано иное, ссылка на PVR или PVR человека относится к полипептиду транскрипта α .

Если не указано иное или не понятно из контекста, используемый в настоящем документе термин "антитело" может включать в себя целые антитела и любые антигенсвязывающие фрагменты (т.е. "антигенсвязывающие части") или их отдельные цепи. Согласно одному варианту осуществления "антитело" относится к гликопротеину, содержащему по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие цепи (L), связанные между собой дисульфидными связями, или его антигенсвязывающему фрагменту. Каждая тяжелая цепь состоит из вариательной области тяжелой цепи (сокращенно в настоящем документе как V_H) и константной области тяжелой цепи. В некоторых встречающихся в природе антителах IgG, IgD и IgA константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов: CH1, CH2 и CH3. В некоторых встречающихся в природе антителах каждая легкая цепь состоит из вариательной области легкой цепи (сокращенно обозначенной в настоящем документе как V_L) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена, CL. Области V_H и V_L можно дополнительно подразделить на области гипервариабельности, которые называются областями определения комплементарности (CDR), чередующимися с областями, которые представляют собой более консервативные и называются каркасными областями (FR). Каждый V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех каркасных областей (FR), расположенных от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариательные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая в себя различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

Антитела, как правило, специфически связываются со своим родственным антигеном с высокой аффинностью, отраженной посредством константы диссоциации (K_D) от 10^{-7} до 10^{-11} М или менее. Как правило, считается, что любая K_D , превышающая приблизительно 10^{-6} М, указывает на неспецифическое связывание. Как используется в настоящем документе, антитело, которое "специфически связывается" с антигеном, относится к антителу, которое связывается с антигеном и, по существу, идентичными антигенами с высокой аффинностью, что означает K_D 10^{-7} М или менее, предпочтительно 10^{-8} М или менее, еще более предпочтительно 5×10^{-9} М или менее и наиболее предпочтительно от 10^{-8} до 10^{-10} М или менее, но не связывается с высокой аффинностью с неродственными антигенами. Антиген является "по существу, идентичным" данному антигену, если он обладает высокой степенью идентичности последовательности по отношению к данному антигену, например, если он проявляет идентичность последовательности, составляющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 97% или даже более предпочтительно по меньшей мере 99%, по отношению к последовательности данного антигена. В качестве примера антитело, которое специфически связывается с человеческим TIGIT, также может реагировать с TIGIT от некоторых видов нечеловекообразных приматов (например, яванского макака), но не может реагировать с TIGIT от других видов или с отличным от TIGIT антигеном.

Антитела могут проявлять модификации на N- и/или C-концевых аминокислотных остатках. Например, антитела по настоящему изобретению могут быть получены из конструкции, кодирующей C-концевой остаток лизина, например на тяжелой цепи, но такой C-концевой лизин может частично или полностью отсутствовать в терапевтическом антителе, которое продается или вводится. Альтернативно, антитело может быть получено из конструкций, которые специфически не кодируют C-концевой остаток лизина, даже несмотря на то, что такой лизин присутствует в исходном антителе, из которого получено терапевтическое антитело. В другом примере N-концевой остаток глутамина или глутаминовой кислоты в антителе по настоящему изобретению может быть частично или полностью превращен в пироглутаминовую кислоту в терапевтическом антителе, которое продается или вводится. Любые формы глутамина или глутаминовой кислоты, присутствующие на N-конце цепи антитела, включая в себя пироглутаминовую кислоту, охватываются используемым в настоящем документе термином "глутамин". Соответственно, предусмотренные в настоящем документе последовательности цепей антител, содержащие N-концевой остаток глутамина или глутаминовой кислоты, охватывают цепи антител независимо от уровня образования пироглутаминовой кислоты.

Если не указано иное, иммуноглобулин может быть любым из широко известных изотипов, включая в себя без ограничения, IgA, секреторный IgA, IgG и IgM. Изотип IgG подразделяется на подклассы у некоторых видов: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 у людей и IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3 у мышей. Иммуноглобу-

лины, например человеческий IgG1, существуют в нескольких аллотипах, которые отличаются друг от друга не более чем несколькими аминокислотами. Если не указано иное, "антитело" может включать в себя, например, моноклональные и поликлональные антитела; химерные и гуманизированные антитела; человеческие и нечеловеческие антитела; полностью синтетические антитела и одноцепочечные антитела.

Используемый в настоящем документе термин "антигенсвязывающая часть" или "антигенсвязывающий фрагмент" антитела относится к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном (например, человеческим TIGIT). Примеры связывающих фрагментов, включенных в термин "антигенсвязывающая часть/фрагмент" антитела, включают в себя (i) фрагмент Fab - моновалентный фрагмент, состоящий из доменов V_L , V_H , CL и CH1; (ii) фрагмент $F(ab')_2$ - двухвалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, соединенных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент Fd, состоящий из доменов V_H и CH1; (iv) фрагмент Fv, состоящий из доменов V_L и V_H одного плеча антитела, и (v) фрагмент dAb (Ward et al, (1989) *Nature* 341:544-546), состоящий из домена V_H . Выделенная определяющая комплементарность область (CDR) или комбинация двух или более выделенных CDR, соединенных синтетическим линкером, может содержать и антигенсвязывающий домен антитела, если он способен связываться с антигеном.

Конструкции антител с одной цепью также включены в настоящее изобретение. Хотя два домена Fv-фрагмента, V_L и V_H , кодируются отдельными генами, их можно объединить с использованием рекомбинантных способов, посредством синтетического линкера, который позволяет получать их в виде единственной белковой цепи, в которой пары областей V_L и V_H образуют одновалентные молекулы, известные как одноцепочечные Fv (scFv); смотрите, например, Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426 и Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Такие одноцепочечные антитела также предназначены для включения в термин "антигенсвязывающая часть/фрагмент" антитела. Эти и другие потенциальные конструкции описаны в Chan & Carter (2010) *Nat. Rev. Immunol.* 10:301. Эти фрагменты антител получают обычными способами, известными специалистам в настоящей области техники, и фрагменты подвергают скринингу на предмет целесообразности таким же образом, как и интактные антитела. Антигенсвязывающие части/фрагменты могут быть получены способами рекомбинантной ДНК или путем ферментативного или химического расщепления интактных иммуноглобулинов.

Если не указано иное, слово "фрагмент" при использовании со ссылкой на антитело, например, в формуле изобретения, относится к антигенсвязывающему фрагменту антитела, так что "антитело или фрагмент" имеет то же значение, что и "антитело или его антигенсвязывающий фрагмент".

"Биспецифическое" или "бифункциональное антитело" представляет собой искусственное гибридное антитело, содержащее две различные пары тяжелой/легкой цепи, что приводит к двум сайтам связывания антигена со специфичностью для разных антигенов. Биспецифические антитела могут быть получены различными способами, включающими в себя слияние гибридом или связывание Fab'-фрагментов. См., например, Songsivilai & Lachmann (1990) *Clin. Exp. Immunol.* 79:315; Kostelny et al. (1992) *J. Immunol.* 148:1547.

Используемый в настоящем документе термин "моноклональное антитело" относится к антителу, которое проявляет единственную специфичность и аффинность связывания для конкретного эпитопа или композиции антител, в которых все антитела проявляют одну специфичность и аффинность связывания к конкретному эпитопу. Как правило, такие моноклональные антитела будут получены из одной клетки или нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело, и будут распространяться без преднамеренного введения любых изменений последовательности. Соответственно, термин "моноклональное антитело человека" относится к моноклональному антителу, которое содержит переменные и необязательные константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Согласно одному варианту осуществления человеческие моноклональные антитела получают посредством гибридомы, например, полученной путем слияния В-клетки, полученной из трансгенного или трансхромосомального отличного от человека животного (например, трансгенной мыши, характеризующейся геномом, содержащим трансген тяжелой цепи человека и трансген легкой цепи), с иммортализованной клеткой.

Используемый в настоящем документе термин "рекомбинантное человеческое антитело" включает в себя все человеческие антитела, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют рекомбинантными средствами, такие как (a) антитела, выделенные из животного (например, мыши), которое является трансгенным или трансхромосомным для генов иммуноглобулина человека или полученной из него гибридомы, (b) антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной для экспрессии антитела, например, из трансфектомы, (c) антитела, выделенные из библиотеки рекомбинантных комбинаторных человеческих антител, и (d) антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими способами, которые предусматривают сплайсинг последовательностей генов человеческого иммуноглобулина с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела содержат переменные и константные области, которые используют определенные последовательности иммуноглобулинов зародышевой линии человека, кодируемые генами зародышевой линии, но включают в себя последующие реаранжировки и мутации, которые происходят, например, во время созревания антител. Как известно в настоящей области техники (см., например, Lonberg (2005)

Nature Biotech. 23(9): 1117-1125), переменная область содержит антигенсвязывающий домен, который кодируется различными генами, которые реаранжируются с образованием антитела, специфического к чужеродному антигену. В дополнение к реаранжировке переменная область может быть дополнительно модифицирована несколькими изменениями отдельных аминокислот (называемыми соматической мутацией или гипермутацией), чтобы увеличить аффинность антитела к чужеродному антигену. Константная область будет изменяться в дальнейшем ответе на антиген (т.е. переключение изотипа). Следовательно, реаранжированные и соматически мутированные последовательности нуклеиновой кислоты, которые кодируют полипептиды легкой цепи и тяжелой цепи иммуноглобулина в ответ на антиген, могут быть не идентичны исходным последовательностям зародышевой линии, но вместо этого будут по существу идентичными или похожими (т.е. характеризоваться идентичностью, составляющей по меньшей мере 80%).

"Человеческое" антитело (HuMAb) относится к антителу, содержащему переменные области, в которых как каркасная, так и CDR-области получены из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Кроме того, если антитело содержит константную область, константная область также происходит от последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Антитела человека по настоящему изобретению могут включать в себя аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии человека (например, мутации, введенные случайным или сайтспецифическим мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*). Однако используемый в настоящем документе термин "человеческое антитело" не предназначен для включения антител, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мышь, были привиты на последовательности каркаса человека. Термины "человеческие" антитела и "полностью человеческие" антитела используются как синонимы.

"Гуманизированное" антитело относится к антителу, в котором некоторые, большинство или все аминокислоты за пределами доменов CDR отличного от человеческого антитела, например мышинного антитела, заменены соответствующими аминокислотами, полученными из иммуноглобулинов человека. Согласно одному варианту осуществления гуманизированной формы антитела некоторые, большинство или все аминокислоты вне доменов CDR были заменены аминокислотами из человеческих иммуноглобулинов, тогда как некоторые, большинство или все аминокислоты в пределах одной или нескольких областей CDR остались неизменными. Допускаются небольшие добавления, делеции, вставки, замены или модификации аминокислот, если они не отменяют способность антитела связываться с определенным антигеном. "Гуманизированное" антитело сохраняет антигенную специфичность, аналогичную таковой оригинального антитела.

"Химерное антитело" относится к антителу, в котором переменные области происходят от одного вида, а константные области происходят от другого вида, такому как антитело, в котором переменные области происходят от мышинного антитела, а константные области происходят от человеческого антитела. "Гибридное" антитело относится к антителу, содержащему тяжелую и легкую цепи разных типов, такие как мышинная (исходная) тяжелая цепь и гуманизированная легкая цепь, или наоборот.

Используемый в настоящем документе термин "изотип" относится к классу антител (например, антителу IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD и IgE), которые кодируются генами константной области тяжелой цепи.

"Аллотип" относится к встречающимся в природе вариантам в конкретной изотипной группе, варианты которых отличаются одной или несколькими аминокислотами. См., например, Jefferis et al. (2009) mAbs 1:1.

Фразы "антитело, распознающее антиген" и "антитело, специфичное к антигену" используются в настоящем документе взаимозаменяемо с термином "антитело, которое специфически связывается с антигеном".

Используемое в настоящем документе "выделенное антитело" относится к антителу, которое, по существу, не содержит других антител, характеризующихся разными антигенными специфичностями (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с TIGIT, по существу, не содержит антител, которые специфически связывают антигены, отличные от TIGIT). Выделенное антитело, которое специфически связывается с эпитопом человеческого TIGIT, может, однако, характеризоваться перекрестной реактивностью к другим белкам TIGIT от разных видов.

Используемое в настоящем документе антитело, которое "ингибирует связывание PVR с TIGIT", относится к антителу, которое ингибирует связывание PVR человека с TIGIT человека с EC₅₀ приблизительно 1 мкг/мл или менее, например приблизительно 0,9 мкг/мл или менее, приблизительно 0,85 мкг/мл или менее, приблизительно 0,8 мкг/мл или менее, приблизительно 0,75 мкг/мл или менее, приблизительно 0,7 мкг/мл или менее, приблизительно 0,65 мкг/мл или менее, приблизительно 0,6 мкг/мл или менее, приблизительно 0,55 мкг/мл или менее, приблизительно 0,5 мкг/мл или менее, приблизительно 0,45 мкг/мл или менее, приблизительно 0,4 мкг/мл или менее, приблизительно 0,35 мкг/мл или менее, приблизительно 0,3 мкг/мл или менее, приблизительно 0,25 мкг/мл или менее, приблизительно 0,2 мкг/мл или менее, приблизительно 0,15 мкг/мл или менее или приблизительно 0,1 мкг/мл или менее, по признанному в настоящей области техники способам, например, в основанном на FACS анализе клеточного связывания.

"Эффекторные функции", полученные из взаимодействия Fc-области антитела с некоторыми Fc-рецепторами, включают в себя, без ограничения, связывание C1q, комплементзависимую цитотоксичность (CDC), связывание с Fc-рецептором, FcγR-опосредованные эффекторные функции, такие как ADCC и антителозависимый клеточноопосредованный фагоцитоз (ADCP) и ингибирующую модуляцию рецептора клеточной поверхности (например, рецептора В-клеток, BCR). Такие эффекторные функции, как правило, требуют, чтобы область Fc объединялась с антигенсвязывающим доменом (например, варибельным доменом антитела).

"Fc-рецептор" или "FcR" представляет собой рецептор, который связывается с Fc-областью иммуноглобулина. FcR, которые связываются с антителом IgG, содержат рецепторы семейства FcγR, включая в себя аллельные варианты и альтернативно сплайсированные формы этих рецепторов. Семейство FcγR состоит из трех активирующих (FcγRI, FcγRII и FcγRIII у мышей, FcγRIA, FcγRIIA и FcγRIIIA у людей) и одного ингибирующего (FcγRIIb или эквивалентного FcγRIIb) рецептора. Различные свойства человеческих FcγR суммированы в табл. 1. Большинство типов врожденных эффекторных клеток коэкспрессируют один или несколько активирующих FcγR и ингибирующий FcγRIIb, тогда как клетки натуральных киллеров (NK) избирательно экспрессируют один активирующий Fc-рецептор (FcγRIII у мышей и FcγRIIIA у людей), но не ингибирующий FcγRIIb у мышей и людей. Человеческий IgG1 связывается с большинством человеческих рецепторов Fc и считается эквивалентным мышинному IgG2a по отношению к типам активирующих рецепторов Fc, с которыми он связывается.

Таблица 1. Свойства человеческих FcγR

Fcγ	Аллельные варианты	Аффинность для IgG человека	Предпочтение по изотипу	Клеточное распределение
FcγRI	Не описаны	Высокая (K _D ~10 нМ)	IgG1=3>4>>2	Моноциты, макрофаги, активированные нейтрофилы, дендритные клетки
FcγRIIA	H131	От низкой до средней	IgG1>3>2>4	Нейтрофилы, моноциты, макрофаги, эозинофилы, дендритные клетки, тромбоциты
	R131	Низкая	IgG1>3>4>2	
FcγRIIIA	V158	Средняя	IgG1=3>>4>2	NK-клетки, моноциты, макрофаги, тучные клетки, эозинофилы, дендритные клетки
	F158	Низкая	IgG1=3>>4>2	
FcγRIIb	I232	Низкая	IgG1=3=4>2	В-клетки, моноциты, макрофаги, дендритные клетки, тучные клетки
	T232	Низкая	IgG1=3=4>2	

"Область Fc" (фрагмент кристаллизующейся области) или "Fc-домен" или "Fc" относится к C-концевой области тяжелой цепи антитела, которая опосредует связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая в себя связывание с рецепторами Fc, расположенными на различных клетках иммунной системы (например, эффекторных клетках) или с первым компонентом (C1q) классической системы комплемента. Таким образом, область Fc содержит константную область антитела, исключая первый домен константной области иммуноглобулина (например, CH1 или CL). В изотипах IgG, IgA и IgD антитела область Fc содержит константные домены C_{H2} и C_{H3} в каждой из двух тяжелых цепей антитела; области IgM и IgE Fc содержат три константных домена тяжелой цепи (домены C_H 2-4) в каждой полипептидной цепи. Для IgG область Fc содержит домены иммуноглобулина Cγ2 и Cγ3 и шарнир между Cγ1 и Cγ2. Хотя границы области Fc тяжелой цепи иммуноглобулина могут варьировать, область Fc тяжелой цепи IgG человека, как правило, определяется как промежуток от аминокислотного остатка в положении C226 или P230 (или аминокислоты между этими двумя аминокислотами) до карбокси-конца тяжелой цепи, причем нумерация соответствует индексу ЕС, как в Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, MD; смотрите также фиг. 3c-3f в публикации заявки на патент США № 2008/0248028. Домен C_{H2} области Fc человеческого IgG простирается от приблизительно аминокислоты 231 до приблизительно аминокислоты 340, тогда как домен C_{H3} расположен на C-концевой стороне домена C_{H2} в Fc-области, т.е. он простирается от приблизительно аминокислоты 341 до приблизительно аминокислоты 447 IgG (включая в себя C-концевую лизин). Используемая в настоящем документе область Fc может представлять собой нативную последовательность Fc, включая в себя любой аллотипический вариант или вариант Fc (например, не встречающуюся в природе Fc). Fc также может относиться к этой области в выделении или в контексте Fc-содержащего белкового полипептида, такого как "связывающий белок, содержащий область Fc", также называемого "слитым белком Fc" (например, антителом или иммуноадгезином).

Если не указано иное или не ясно из контекста, нумерация аминокислотных остатков в области Fc антитела соответствует стандарту нумерации EU, за исключением случаев, когда конкретно упоминают-

ся остатки в последовательности в перечне последовательностей, и в этом случае нумерация обязательно последовательна. Например, литературные ссылки, касающиеся влияния аминокислотных замещений в области Fc, как правило, будут использовать нумерацию EU, что позволяет ссылаться на любой данный остаток в области Fc антитела под одним и тем же числом, независимо от длины варибельного домена, к которому он прикреплен. В редких случаях может потребоваться сослаться на документ, на который ссылаются, чтобы подтвердить точный остаток Fc.

"Область Fc с нативной последовательностью" или "Fc с нативной последовательностью" содержит аминокислотную последовательность, которая идентична аминокислотной последовательности природной области Fc. Области Fc человека с нативными последовательностями включают в себя область Fc человеческого IgG1 с нативной последовательностью; область Fc человеческого IgG2 с нативной последовательностью; область Fc человеческого IgG3 с нативной последовательностью и область Fc человеческого IgG4 с нативной последовательностью, а также их встречающиеся в природе варианты. Fc с нативными последовательностями включают в себя различные аллотипы Fc. См., например, Jefferis et al. (2009) mAbs 1:1.

Термин "эпитоп" или "антигенная детерминанта" относится к сайту на антигене (например, TIGIT), с которым специфически связывается иммуноглобулин или антитело.

Эпитопы в белковых антигенах могут образовываться как из смежных аминокислот (как правило, линейного эпитопа), так и из несмежных аминокислот, приводимых в соприкосновение посредством третичной укладки белка (как правило, конформационного эпитопа). Эпитопы, образованные из смежных аминокислот, как правило, но не всегда, сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образованные путем третичной укладки, как правило, утрачиваются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп, как правило, включает в себя по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот в уникальной пространственной конформации.

Термин "картирование эпитопов" относится к процессу идентификации молекулярных детерминант на антигене, участвующем в распознавании антител-антигенов. Способы определения того, какие эпитопы связаны данным антителом, хорошо известны в настоящей области техники и предусматривают, например, анализы иммуноблоттинга и иммунопреципитации, в которых перекрывающиеся или смежные пептиды (например, из TIGIT) исследуют на реактивность с данным антителом (например, антителом к TIGIT); рентгеновскую кристаллографию; 2-мерный ядерный магнитный резонанс; дрожжевой дисплей (смотрите пример 4 в настоящем документе); и HDX-MS (см., например, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)).

Термин "связывается с одним и тем же эпитопом" применительно к двум или более антителам означает, что антитела связываются с одним и тем же сегментом аминокислотных остатков, как определено данным способом. Техники определения того, связываются ли антитела с "одним и тем же эпитопом на TIGIT" с описанными в настоящем документе антителами, включают в себя, например, способы картирования эпитопов, такие как рентгенографический анализ кристаллов комплексов антиген:антитело, который обеспечивает атомное разрешение эпитопа, и масс-спектрометрию с обменом водорода/дейтерия (HDX-MS). Другие способы контролируют связывание антитела с фрагментами антигена (например, протеолитическими фрагментами) или мутированными вариациями антигена, где потеря связывания вследствие модификации аминокислотного остатка в антигенной последовательности часто считается показателем эпитопного компонента, например сканирующий аланином мутагенез (Cunningham & Wells (1985) Science 244:1081) или дрожжевой дисплей вариантов мутантной последовательности-мишени (смотрите пример 4 в настоящем документе). Кроме того, можно также использовать вычислительные комбинаторные способы для картирования эпитопов. Эти способы основаны на способности представляющего интерес антитела к аффинному выделению специфических коротких пептидов из комбинаторных пептидных библиотек фагового дисплея. Ожидается, что антитела, содержащие одинаковые или близкородственные VH и VL или те же последовательности CDR, будут связываться с одним и тем же эпитопом.

Антитела, которые "конкурируют с другим антителом за связывание с мишенью", относятся к антителам, которые ингибируют (частично или полностью) связывание другого антитела с мишенью. Конкурируют ли два антитела друг с другом за связывание с мишенью, т.е. ингибирует ли и в какой степени одно антитело связывание другого антитела с мишенью, может быть определено с использованием известных конкурентных экспериментов. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело конкурирует и ингибирует связывание другого антитела с мишенью по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100%. Уровень ингибирования или конкуренции может быть различным в зависимости от того, какое антитело является "блокирующим антителом" (т.е. холодным антителом, которое сначала инкубируется с мишенью). Конкурентные анализы могут проводиться, как описано, например, в Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harb. Protoc; 2006; doi:10.1101/pdb.prot4277 или в главе 11 в "Using Antibodies" by Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA 1999. Конкурирующие антитела связываются с одним и тем же эпитопом, перекрывающимся эпитопом или с соседними эпитопами (например, о чем свидетельствует стерическое затруднение).

Другие анализы конкурентного связывания включают в себя: твердофазный прямой или косвенный

радиоиммуноанализ (RIA), твердофазный прямой или косвенный иммуноферментный анализ (EIA), конкурентный сэндвич-анализ (см. Stahli et al. (1983) *Methods in Enzymology* 9:242); твердофазный прямой биотин-авидиновый EIA (см. Kirkland et al. (1986) *J. Immunol.* 137:3614); твердофазный анализ с прямым мечением, сэндвич-анализ твердой фазы с прямой детекцией и ферментативной меткой (см. Harlow and Lane (1988), *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press); твердофазный анализ с прямой детекцией RIA с использованием метки I-125 (см. Morel et al. (1988) *Mol. Immunol.* 25(1):7); твердофазный прямой биотин-авидиновый EIA (Cheung et al. (1990) *Virology* 176:546) *Virology* 176: 546); и RIA с прямым мечением. (Moldenhauer et al. (1990) *Scand. J. Immunol.* 32:77).

Используемый в настоящем документе термин "специфическое связывание", "избирательное связывание", "избирательно связывается" и "специфически связывается" относится к связыванию антитела с эпитопом на предварительно определенном антигене, но не с другими антигенами. Как правило, антитело (i) связывается с равновесной константой диссоциации (K_d) составляющей приблизительно менее 10^{-7} М, например, приблизительно менее 10^{-8} , 10^{-9} или 10^{-10} М или даже ниже, когда определяется посредством, например, технологии поверхностного плазмонного резонанса (SPR) в приборе для поверхностного плазмонного резонанса BIACORE® 2000 с использованием заранее определенного антигена, например, реккомбинантного человеческого TIGIT в качестве анализа и антитела в качестве лиганда, или анализ Скэтчарда связывания антитела с антиген-положительными клетками и (ii) связывается с предопределенным антигеном с аффинностью, которая по меньшей мере в два раза больше его аффинности в связывании с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеином), отличным от предопределенного антигена или близкородственного антигена. Соответственно, антитело, которое "специфически связывается с человеческим TIGIT", относится к антителу, которое связывается с растворимым или связанным с клеткой человеческим TIGIT с K_D 10^{-7} М или менее, например, приблизительно менее чем 10^{-8} , 10^{-9} или 10^{-10} М или даже ниже. Антитело, которое "перекрестно реагирует с TIGIT яванского макака", относится к антителу, которое связывается с TIGIT яванского макака с K_D 10^{-7} М или менее, например, приблизительно менее чем 10^{-8} , 10^{-9} или 10^{-10} М или даже ниже.

Используемый в настоящем документе термин " k_{assoc} " или " k_a " относится к константе скорости ассоциации для конкретного взаимодействия антитело-антиген, тогда как используемый в настоящем документе термин " k_{dis} " или " k_d " относится к константе скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Используемый в настоящем документе термин " K_D " относится к равновесной константе диссоциации, которую получают из отношения k_d к k_a (например, k_d/k_a) и выражают в виде молярной концентрации (М). Значения K_D для антител могут быть определены с использованием способов, хорошо известных в настоящей области техники. Предпочтительные способы определения K_D антитела предусматривают анализ интерферометрии биослоев (BLI), предпочтительно с использованием устройства Fortebio Octet RED, поверхностного плазмонного резонанса, предпочтительно с использованием биосенсорной системы, такой как система поверхностного плазмонного резонанса BIACORE® (см., например, пример 2), или проточной цитометрии и анализа Скэтчарда.

Используемый в настоящем документе термин "высокая аффинность" для антитела IgG относится к антителу, характеризующемуся K_D 10^{-8} М или менее, более предпочтительно 10^{-9} М или менее и даже более предпочтительно 10^{-10} М или менее для антигена-мишени. Однако "высокоаффинное" связывание может варьировать для других изоформ антител. Например, "высокоаффинное" связывание для изоформы IgM относится к антителу, характеризующемуся K_D 10^{-7} М или менее, более предпочтительно 10^{-8} М или менее.

Термин " EC_{50} " в контексте анализа *in vitro* или *in vivo* с использованием антитела или его антиген-связывающего фрагмента относится к концентрации антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, который индуцирует ответ, который составляет 50% максимального ответа, т.е. находится между максимальным ответом и базовой линией.

Термин "связывается с иммобилизованным TIGIT" относится к способности описанного в настоящем документе антитела связываться с TIGIT, например экспрессированным на поверхности клетки или прикрепленным к твердой подложке.

Используемый в настоящем документе термин "перекрестные реакции" относится к способности описанного в настоящем документе антитела связываться с TIGIT от другого вида. Например, описанное в настоящем документе антитело, которое связывается с человеческим TIGIT, также может связываться с TIGIT от другого вида (например, TIGIT яванского макака). Используемая в настоящем документе кросс-реактивность может быть измерена путем обнаружения специфической реакционной способности с очищенным антигеном в анализах связывания (например, SPR, ELISA) или связывания или иного функционального взаимодействия с клетками, физиологически экспрессирующими TIGIT. Способы определения перекрестной реактивности предусматривают стандартные анализы связывания, как описано в настоящем документе, например, с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса BIACORE® (SPR) с использованием прибора BIACORE® 2000 SPR (Biacore AB, Uppsala, Sweden) или проточной цитометрической техники.

Используемый в настоящем документе термин "встречающийся в природе" применительно к объек-

ту относится к тому факту, что объект можно найти в природе. Например, полипептидная или полинуклеотидная последовательность, которая присутствует в организме (включая в себя вирусы), которая может быть выделена из источника в природе и которая не была намеренно изменена человеком в лаборатории, представляет собой встречающуюся в природе.

"Полипептид" относится к цепи, содержащей по меньшей мере два последовательно связанных аминокислотных остатка без верхнего предела длины цепи. Один или несколько аминокислотных остатков в белке могут содержать модификацию, такую как, без ограничения, гликозилирование, фосфорилирование или дисульфидную связь. "Белок" может содержать один или несколько полипептидов.

Используемый в настоящем документе термин "молекула нуклеиновой кислоты" предназначен для включения молекул ДНК и молекул РНК. Молекула нуклеиновой кислоты может быть одноцепочечной или двухцепочечной и может представлять собой кДНК.

Также предусмотрены "консервативные модификации последовательности" предусмотренной в настоящем документе последовательности антител, т.е. модификации нуклеотидной и аминокислотной последовательностей, которые не отменяют связывание антитела, кодируемого нуклеотидной последовательностью или содержащей аминокислотную последовательность, с антигеном. Например, модификации могут быть введены стандартными способами, известными в настоящей области техники, такими как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. Консервативные модификации последовательности включают в себя консервативные аминокислотные замены, в которых аминокислотный остаток заменен аминокислотным остатком, имеющим сходную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, характеризующиеся сходными боковыми цепями, были определены в настоящей области техники. Эти семейства включают в себя аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), β -разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, предсказанный заменимый аминокислотный остаток в антителе к TIGIT предпочтительно заменяется другим аминокислотным остатком из того же семейства боковой цепи. Способы идентификации нуклеотидных и аминокислотных консервативных замен, которые не устраняют связывание антигена, хорошо известны в настоящей области техники. См., например, Brummell et al., *Biochem.* 32:1180-1187 (1993); Kobayashi et al. *Protein Eng.* 12(10):879-884 (1999) и Burks et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412-417 (1997).

Альтернативно, согласно другому варианту осуществления мутации могут быть введены случайным образом по всей или части кодирующей последовательности антитела к TIGIT, например путем насыщающего мутагенеза, и полученные модифицированные антитела к TIGIT можно подвергнуть скринингу для улучшения активности связывания.

Для нуклеиновых кислот термин "существенная гомология" указывает на то, что две нуклеиновые кислоты или их обозначенные последовательности при оптимальном выравнивании и сравнении представляют собой идентичные, с соответствующими нуклеотидными вставками или делециями, по меньшей мере приблизительно на 80% нуклеотидов, как правило, по меньшей мере на 90-95% и более предпочтительно по меньшей мере на приблизительно 98%-99,5% нуклеотидов. Альтернативно, существенная гомология существует, когда сегменты гибридизуются в условиях селективной гибридизации, к комплементарной цепи.

Для полипептидов термин "существенная гомология" указывает на то, что два полипептида или их обозначенные последовательности при оптимальном выравнивании и сравнении идентичны, с соответствующими аминокислотными введениями или делециями, по меньшей мере приблизительно на 80% аминокислот, как правило, по меньшей мере на 90-95% и более предпочтительно по меньшей мере на 98-99,5% аминокислот.

Процент идентичности между двумя последовательностями представляет собой функцию количества идентичных положений, разделяемых последовательностями, когда последовательности оптимально выровнены (т.е. % гомологии = количество идентичных положений/общее количество положений \times 100) с оптимальным выравниванием, определяемым с учетом количества гэпов и длины каждого гэпа, которые необходимо ввести для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процентной идентичности между двумя последовательностями может быть выполнено с использованием математического алгоритма, как описано в приведенных ниже неограничивающих примерах.

Процент идентичности между двумя нуклеотидными последовательностями может быть определен с использованием программы GAP в программном пакете GCG с использованием матрицы NWSgapdna.CMP и штрафом за открытие гэпа 40, 50, 60, 70 или 80 и штрафом за удлинение гэпа 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Процент идентичности между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями также может быть определен с использованием алгоритма Мейерса и Миллера (CABIOS, 4: 11-17

(1989)), который был включен в программу ALIGN (версия 2.0), с использованием таблицы весов замен остатков PAM120, штрафом за продление гэпа 12 и штрафом за гэп 4. Кроме того, процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями может быть определен с использованием алгоритма Нидлмана-Вунша (J. Mol. Biol, 48): 444-453 (1970)), который был включен в программу GAP в программном пакете GCG, с использованием либо матрицы Blossum 62, либо матрицы PAM250, и штрафом за открытие гэпа 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и штрафом за удлинение гэпа 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Описанные в настоящем документе последовательности нуклеиновой кислоты и белка могут дополнительно использоваться в качестве "запрашиваемой последовательности" для выполнения поиска по открытым базам данных, например, для идентификации родственных последовательностей. Такие поиски могут выполняться с использованием программ NBLAST и XBLAST (версия 2.0) Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Поиск нуклеотидов BLAST может выполняться с помощью программы NBLAST, оценка = 100, длина слова = 12 для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных описанным в настоящем документе молекулам нуклеиновой кислоты. Поиск BLAST белка выполняется с помощью программы XBLAST, оценка = 50, длина слова = 3 для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных описанным в настоящем документе белковым молекулам. Чтобы получить сопоставленные выравнивания для целей сравнения, можно использовать Gapped BLAST, как описано в Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST могут использоваться параметры по умолчанию для соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST).

Нуклеиновые кислоты могут присутствовать в целых клетках, в клеточном лизате или в частично очищенной или по существу чистой форме. Нуклеиновая кислота представляет собой "выделенную" или "приведенную к существенной чистоте" при очистке от других клеточных компонентов или других загрязняющих веществ, например других клеточных нуклеиновых кислот (например, других частей хромосомы) или белков, стандартными способами, включая в себя воздействие щелочами/ДСН, CsCl бэндинг, колоночную хроматографию, электрофорез в агарозном геле и другие, хорошо известные в настоящей области техники. См. F. Ausubel et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987).

Используемый в настоящем документе термин "вектор" предназначен для обозначения молекулы нуклеиновой кислоты, способной транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она была связана. Один тип вектора представляет собой "плазмиду", которая относится к циклической двухцепочечной петле ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Другим типом вектора является вирусный вектор, в котором дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Некоторые векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они вводятся (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальное происхождение репликации, и эписомальные векторы млекопитающего). Другие векторы (например, неэписомальные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина и, таким образом, реплицироваться вместе с геном-хозяином. Более того, некоторые векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы упоминаются в настоящем документе как "рекомбинантные экспрессирующие векторы" (или просто "экспрессирующие векторы"). В общем, экспрессирующие векторы практической ценности в способах рекомбинантной ДНК часто находятся в форме плазмид. В настоящем описании "плазида" и "вектор" могут быть взаимозаменяемы, поскольку плазида является наиболее часто используемой формой вектора. Однако также включены другие формы экспрессирующих векторов, такие как вирусные векторы (например, репликационные дефектные ретровирусы, аденовирусы и адено-ассоциированные вирусы), которые выполняют эквивалентные функции.

Используемый в настоящем документе термин "рекомбинантная клетка-хозяин" (или просто "клетка-хозяин") предназначен для обозначения клетки, которая содержит нуклеиновую кислоту, которая в природе не присутствует в клетке, и может быть клетки, в которую вводили рекомбинантный вектор экспрессии. Следует понимать, что такие термины предназначены для обозначения не только конкретной подвергаемой исследованию клетки, но и потомства такой клетки. Поскольку определенные модификации могут происходить в последующих поколениях из-за мутаций или воздействий окружающей среды, такое потомство не может, по сути, быть идентичным исходной клетке, но все еще включено в объем используемого в настоящем документе термина "клетка-хозяин".

"Иммунный ответ" относится к биологическому ответу у позвоночных против чужеродных агентов, ответ которого защищает организм от этих агентов и вызванных ими заболеваний. Иммунный ответ опосредуется действием клетки иммунной системы (например, Т-лимфоцита, В-лимфоцита, клетки натурального киллера, макрофага, эозинофила, тучной клетки, дендритной клетки или нейтрофила) и растворимыми макромолекулами, производимыми любой из этих клеток или печенью (включая в себя антитела, цитокины и комплемент), что приводит к избирательному нацеливанию, связыванию, повреждению, разрушению и/или удалению из организма позвоночных инвазивных патогенов, клеток или тканей, инфицированных патогенами, злокачественных или других аномальных клеток или, в случае аутоиммунитета или патологического воспаления, нормальных человеческих клеток или тканей. Иммунный ответ

включает в себя, например, активацию или ингибирование Т-клетки, например, эффекторной Т-клетки или Т_h-клетки, такой как CD8⁺ или CD4⁺ Т-клетки, или ингибирование или истощение клетки Т_{reg}. "Т-эффекторные" ("Т_{eff}") клетки относятся к Т-клеткам (например, CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеткам) с цитолитической активностью, а также к Т-хелперным клеткам (Т_h), которые секретируют цитокины и активируют и направляют другие иммунные клетки, но не включают в себя регуляторные Т-клетки (клетки Т_{reg}).

Используемый в настоящем документе термин "опосредуемый Т-клеткой ответ" относится к ответу, опосредованному Т-клетками, включая в себя эффекторные Т-клетки (например, клетки CD8⁺) и хелперные Т-клетки (например, клетки CD4⁺). Опосредуемые Т-клетками ответы включают в себя, например, цитотоксичность и пролиферацию Т-клеток.

Используемый в настоящем документе термин "ответ цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL)" относится к иммунному ответу, индуцированному цитотоксическими Т-клетками. CTL-ответы опосредуются в основном CD8⁺ Т-клетками.

"Иммуномодулятор" или "иммунорегулятор" относится к средству, например компоненту сигнального пути, который может быть включен в модуляцию, регулирование или модификацию иммунного ответа. "Модулирование", "регулирование" или "модификация" иммунного ответа относится к любому изменению в клетке иммунной системы или активности такой клетки (например, эффекторной Т-клетки). Такая модуляция предусматривает стимуляцию или супрессию иммунной системы, что может проявляться в увеличении или уменьшении числа различных типов клеток, увеличении или уменьшении активности этих клеток или любых других изменениях, которые могут возникать в иммунной системе. Были идентифицированы как ингибирующие, так и стимулирующие иммуномодуляторы, некоторые из которых могут характеризоваться улучшенной функцией в опухолевом микроокружении.

Согласно предпочтительным вариантам осуществления иммуномодулятор расположен на поверхности Т-клетки. "Иммуномодулирующая мишень" или "иммунорегуляторная мишень" представляет собой иммуномодулятор, который нацелен на связывание, и активность которого изменяется связыванием вещества, средства, фрагмента, соединения или молекулы. Иммуномодулирующие мишени включают в себя, например, рецепторы на поверхности клетки ("иммуномодулирующие рецепторы") и рецепторные лиганды ("иммуномодулирующие лиганды").

"Иммунотерапия" относится к лечению субъекта, страдающего от заболевания или подверженного риску заражения, или страдающего рецидивом заболевания посредством способа, предусматривающего индуцирование, усиление, супрессию или иное изменение иммунного ответа.

"Иммуностимулирующая терапия" или "иммуностимуляторная терапия" относится к терапии, которая приводит к увеличению (индуцированию или усилению) иммунного ответа у субъекта для, например, лечения злокачественной опухоли.

"Потенцирование эндогенного иммунного ответа" означает повышение эффективности или потенциальной возможности существующего иммунного ответа у субъекта. Это повышение эффективности и потенциальной возможности может быть достигнуто, например, путем преодоления механизмов, которые подавляют эндогенный иммунный ответ хозяина, или стимуляции механизмов, которые усиливают эндогенный иммунный ответ хозяина.

Используемый в настоящем документе термин "связанный" относится к ассоциации двух или более молекул. Связь может быть ковалентной или нековалентной. Связь также может быть генетической (т.е. посредством рекомбинантного слияния). Такие связи могут быть достигнуты с использованием широкого спектра признанных в настоящей области техники способов, таких как химическое сопряжение и производство рекомбинантного белка.

Используемый в настоящем документе термин "введение" относится к физическому введению композиции, содержащей терапевтическое средство, субъекту с использованием любого из различных способов и систем доставки, известных специалистам в настоящей области техники. Предпочтительные пути введения для описанных в настоящем документе антител включают в себя внутривенный, внутривнутрибрюшинный, внутримышечный, подкожный, спинальный или другой парентеральный путь введения, например, путем инъекции или инфузии. Используемая в настоящем документе фраза "парентеральное введение" означает способы введения, отличные от энтерального и местного введения, как правило, путем инъекции, и включают в себя, без ограничения, внутривенную, внутривнутрибрюшинную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутривнутрилимфатическую, внутривнутричерепную, внутривнутрикапсулярную, внутривнутриглазничную, внутривнутрисердечную, интравнутридермальную, транстрахеальную, подкожную, внутривнутрикожную, внутривнутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интравнутристеральную инъекцию и инфузию, а также электропорацию *in vivo*. Альтернативно, описанное в настоящем документе антитело можно вводить с помощью непарентерального пути, такого как местный, эпидермальный или слизистый путь введения, например интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или местно. Введение также может выполняться, например, однократно, многократно и/или в течение одного или нескольких длительных периодов.

Используемые в настоящем документе термины "ингибирует" или "блокирует" (например, ссылаясь на ингибирование/блокирование связывания PVR с TIGIT на клетках) используются взаимозаменяемо и охватывают как частичное, так и полное ингибирование/блокирование, например, по меньшей мере при-

близительно на 50, 60, 70, 80, 90, 95, 99 или 100%.

Используемый в настоящем документе термин "злокачественная опухоль" относится к широкой группе заболеваний, характеризующихся неконтролируемым ростом аномальных клеток в организме. Нерегулируемое деление клеток может привести к образованию злокачественных опухолей или клеток, которые вторгаются в соседние ткани и могут метастазировать в отдаленные части тела через лимфатическую систему или кровотоки.

"Гематологическое злокачественное новообразование" включает в себя лимфому, лейкоз, миелому или лимфоидное злокачественное новообразование, а также злокачественную опухоль селезенки и лимфатических узлов. Иллюстративные лимфомы включают в себя как В-клеточные лимфомы, так и Т-клеточные лимфомы. В-клеточные лимфомы включают в себя как лимфомы Ходжкина, так и большинство неходжкинских лимфом. Неограничивающие примеры В-клеточных лимфом включают в себя диффузную В-крупноклеточную лимфому, фолликулярную лимфому, лимфому лимфатической ткани слизистых оболочек, мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (перекрывается с хроническим лимфоцитарным лейкозом), лимфому мантийных клеток (MCL), лимфому Беркитта, медиастинальную В-крупноклеточную лимфому, макроглобулинемию Вальденстрема, узловую В-клеточную лимфому из клеток краевой зоны, лимфому маргинальной зоны селезенки, внутрисосудистую В-крупноклеточную лимфому, первичная эффузионную лимфому, лимфоматоидный гранулематоз. Неограничивающие примеры Т-клеточных лимфом включают в себя экстранодальную Т-клеточную лимфому, кожные Т-клеточные лимфомы, анапластическую крупноклеточную лимфому и ангиоиммунобластическую Т-клеточную лимфому. Гематологические злокачественные новообразования также включают в себя лейкоз, такой как без ограничения, вторичный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, острый миелолейкоз, хронический миелолейкоз и острый лимфобластный лейкоз. Гематологические злокачественные новообразования дополнительно включают в себя миеломы, такие как без ограничения, множественная миелома и вялотекущая множественная миелома. Другие гематологические и/или связанные с В-клетками или Т-клетками виды злокачественных опухолей охватываются термином гематологическое злокачественное новообразование.

Используемые в настоящем документе термины "лечить" и "лечение" относятся к любому типу вмешательства или процессу, выполняемому на субъекте, или введению ему активного средства с целью обращения вспять, облегчения, ослабления, ингибирования или замедления, или предотвращения прогрессирования, развития, тяжести или повторения симптома, осложнения, состояния или биохимических признаков, связанных с заболеванием. Профилактика относится к введению субъекту, у которого нет заболевания, для предотвращения возникновения заболевания или минимизации его последствия, если оно наступит.

Термин "эффективная доза" или "эффективная дозировка" определяется как количество, достаточное для достижения или, по меньшей мере, частичного достижения желаемого эффекта. "Терапевтически эффективное количество" или "терапевтически эффективная дозировка" лекарственного средства или терапевтического средства представляет собой любое количество лекарственного средства, которое при использовании отдельно или в сочетании с другим терапевтическим средством способствует регрессии заболевания, о чем свидетельствует снижение выраженности симптомов заболевания, увеличение частоты и продолжительности периодов без симптомов заболевания или предотвращение недееспособности или инвалидности из-за заболевания. "Профилактически эффективное количество" или "профилактически эффективная дозировка" лекарственного средства представляет собой количество лекарственного средства, которое при введении отдельно или в сочетании с другим терапевтическим средством субъекту, подверженному риску развития заболевания или страдающему от рецидива заболевания, ингибирует развитие или рецидив заболевания. Способность терапевтического или профилактического средства стимулировать регрессию заболевания или ингибировать развитие или рецидив заболевания может быть оценена с использованием различных способов, известных квалифицированному практику, например, у субъектов-людей во время клинических испытаний, в системах животных моделей, предсказывающих эффективность у людей, или путем анализа активности средства в анализах *in vitro*.

В качестве примера противоопухолевого средства выступает лекарственное средство, которое замедляет прогрессирование злокачественной опухоли или способствует регрессии злокачественной опухоли у субъекта. Согласно предпочтительным вариантам осуществления терапевтически эффективное количество лекарственного средства способствует регрессии злокачественной опухоли до степени устранения злокачественной опухоли. "Способствование регрессии злокачественной опухоли" означает, что введение эффективного количества лекарственного средства, отдельно или в сочетании с противоопухолевым средством, приводит к уменьшению роста или размера опухоли, некрозу опухоли, снижению выраженности по меньшей мере одного симптома заболевания, увеличению частоты и продолжительности периодов заболевания без симптомов, предотвращению недееспособности или инвалидности из-за заболевания или иному уменьшению интенсивности симптомов заболевания у пациента. Фармакологическая эффективность относится к способности лекарственного средства способствовать регрессии злокачественной опухоли у пациента. Физиологическая безопасность относится к приемлемому низкому уровню токсичности или других неблагоприятных физиологических эффектов на клеточном, органном и/или организменном

уровне (побочные эффекты), возникающих в результате введения лекарственного средства.

В качестве примера для лечения опухолей терапевтически эффективное количество или дозировка лекарственного средства предпочтительно ингибирует рост клеток или рост опухоли по меньшей мере на 20%, более предпочтительно по меньшей мере на 40%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 60% и еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 80% относительно не подвергающихся лечению субъектов. Согласно наиболее предпочтительным вариантам осуществления терапевтически эффективное количество или дозировка лекарственного средства полностью ингибирует рост клеток или рост опухоли, т.е. предпочтительно ингибирует рост клеток или рост опухоли на 100%. Способность соединения ингибировать рост опухоли можно оценить с использованием описанных ниже анализов. Ингибирование роста опухоли может происходить не сразу после лечения и может происходить только через некоторое время или после повторного введения. Альтернативно, это свойство композиции может быть оценено путем изучения способности соединения ингибировать рост клеток, такое ингибирование можно измерить *in vitro* с помощью анализов, известных квалифицированному практику. Согласно другим описанным в настоящем документе предпочтительным вариантам осуществления регрессия опухоли может наблюдаться и может продолжаться в течение по меньшей мере приблизительно 20 дней, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 40 дней или даже более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 60 дней.

Используемая в настоящем документе "комбинированная" терапия, если не ясно из контекста, подразумевает введение двух или более терапевтических средств скоординированным образом и включает в себя, без ограничения, одновременное дозирование. Конкретно, комбинированная терапия охватывает как совместное введение (например, введение совместного состава или одновременное введение отдельных терапевтических композиций), так и непрерывное или последовательное введение, при условии, что введение одного терапевтического средства каким-то образом зависит от введения другого терапевтического средства. Например, одно терапевтическое средство можно вводить только после того, как вводится другое терапевтическое средство и ему дают действовать в течение заданного периода времени. См., например, Kohrt et al. (2011) Blood 117:2423.

Термины "пациент" и "субъект" относятся к любому человеку или отличному от человека животному, которое получает либо профилактическое, либо терапевтическое лечение. Например, описанные в настоящем документе способы и композиции могут использоваться для лечения субъекта, характеризующегося наличием злокачественной опухоли. Термин "отличное от человека животное" включает в себя всех позвоночных животных, например млекопитающих и не млекопитающих, таких как нечеловекообразные приматы, овца, собака, корова, цыплята, амфибии, рептилии и т.д.

Различные описанные в настоящем документе аспекты описаны более подробно в следующих подразделах.

I. Антитела к TIGIT.

В настоящей заявке раскрыты полностью человеческие антитела к huTIGIT, характеризующиеся желательными свойствами для использования в качестве терапевтических средств при лечении таких заболеваний, как злокачественные заболевания. Эти свойства включают в себя одно или несколько из следующего: способность связываться с человеческим TIGIT с высокой аффинностью, способность связываться с TIGIT яванского макака, способность блокировать связывание PVR (и, таким образом, передачу сигналов) и отсутствие недостатков последовательности, которые могут уменьшить химическую стабильность антитела.

Антитела к TIGIT, раскрытые в настоящем документе по последовательности, связываются со специфическими эпитопами на человеческом TIGIT, как описано в примере 4 и показано на фиг. 2A-2C. Три специфических антитела, для которых были определены эпитопы, связываются в аналогичных областях человеческого TIGIT, но различаются, с какими специфическими аминокислотными остатками контактируют. Эти антитела обладают свойствами связывания с TIGIT человека с высокой аффинностью и обладают способностью блокировать связывание PVR. Соответственно, другие антитела, которые связываются с теми же или близкородственными эпитопами, вероятно, будут характеризоваться теми же желательными свойствами и могут быть обнаружены в результате конкурентных экспериментов.

Кроме того, антитело 22G2 связывается с TIGIT яванского макака, по существу, с той же аффинностью, с которой оно связывается с человеческим TIGIT, что удобно, когда необходимо проводить исследования токсичности в поддержку нормативного утверждения для применения антитела в качестве терапевтического средства для человека. Другие антитела к TIGIT, которые связываются с теми же или похожими эпитопами, что и 15A6 и 22G2, вероятно, разделяют это выгодное свойство связывания с супо-TIGIT. Антитела, связывающиеся с подобными эпитопами, могут быть обнаружены путем проведения конкурентных экспериментов или путем непосредственного определения их эпитопов.

Антитела к TIGIT, которые конкурируют с описанными в настоящем документе антителами к huTIGIT.

Антитела к huTIGIT, которые конкурируют с антителами по настоящему изобретению за связывание с huTIGIT, такими как 15A6 и 22G2, могут быть получены с использованием протоколов иммунизации, аналогичных описанным в настоящем документе (пример 1). Антитела, которые конкурируют за

связывание с описанными в настоящем документе антителами к huTIGIT, также могут быть получены посредством иммунизации мышей TIGIT человека или конструкцией, содержащей его внеклеточный домен (остатки 22-141 SEQ ID NO: 1; NP_776160.2) или посредством иммунизации фрагментом TIGIT человека, содержащим эпитоп, связанный описанными в настоящем документе антителами к huTIGIT (например, 15A6, 22G2 и 11G11). Полученные в результате антитела могут быть подвергнуты скринингу на способность блокировать связывание 15A6 или 22G2 с человеческим TIGIT хорошо известными в настоящей области техники способами, например блокирование связывания со слитым белком внеклеточного домена TIGIT и домена Fc иммуноглобулина в ELISA или блокирование способности связываться с клетками, экспрессирующими huTIGIT на своей поверхности, например, с помощью FACS. Согласно различным вариантам осуществления исследуемое антитело контактирует со слитым белком TIGIT-Fc (или с клетками, экспрессирующими huTIGIT на своей поверхности) до того, в то же самое время или после добавления 15A6 или 22G2. Например, могут быть выполнены эксперименты "сортировки на группы" (пример 3), чтобы определить, попадает ли антитело в ту же "группу", что и антитела 15A6 или 22G2, в этих экспериментах антитела 15A6 или 22G2 называются "эталонными" антителами, а подвергаемые исследованию антитела называются "исследуемыми" антителами. Антитела, которые снижают связывание 15A6 и/или 22G2 с TIGIT (либо в виде Fc-слияния, либо на клетке), особенно приблизительно в стехиометрических концентрациях, вероятно, будут связываться с одинаковыми перекрывающимися или смежными эпитопами и, таким образом, могут характеризоваться теми же желательными функциональными свойствами 15A6 и 22G2. Конкурирующие антитела также могут быть идентифицированы с использованием других способов, известных в настоящей области техники. Например, могут быть использованы стандартные анализы ИФА или конкурентные анализы ИФА, в которых рекомбинантную белковую конструкцию TIGIT человека иммобилизуют на пластине, добавляют различные концентрации немеченого исследуемого антитела, промывают пластину, добавляют меченые эталонные антитела, промывают и измеряют количество связанной метки. Если увеличивающаяся концентрация немеченого исследуемого антитела ингибирует связывание меченого эталонного антитела, считается, что исследуемое антитело ингибирует связывание эталонного антитела с мишенью на пластине или, как говорят, конкурирует со связыванием эталонного антитела. Дополнительно или альтернативно, может использоваться анализ SPR BIACORE® для оценки способности антител конкурировать. Способность исследуемого антитела ингибировать связывание описанного в настоящем документе антитела к huTIGIT с TIGIT демонстрирует, что исследуемое антитело может конкурировать с эталонным антителом за связывание с TIGIT.

Соответственно, в настоящем документе предусмотрены антитела к TIGIT, которые ингибируют связывание описанных в настоящем документе антител к huTIGIT с TIGIT на клетках, например, активированных Т-клетках, по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% и/или чье связывание с TIGIT на клетках, например, активированных Т-клетках, ингибируется по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%, например, как измерено с помощью ИФА или FACS, например, с использованием анализа, описанного в следующем параграфе.

Иллюстративный конкурентный эксперимент для определения того, блокирует ли исследуемое антитело связывание с (т.е. "конкурирует с") контрольным антителом, может быть проведен следующим образом: активированные Т-клетки человека получают следующим образом: мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяют из цельной крови человека с использованием градиента Ficoll и активируют с помощью 10 мкг/мл фитогемагглютинаина (PHA-L) (USBiol # P3370-30) и 200 ИЕ/мл рекомбинантного IL-2 (Peprotech # 200-02) в течение 3 дней. Активированные Т-клетки ресуспендируют в FACS-буфере (PBS с 5% фетальной бычьей сывороткой) и высевают в количестве 10^5 клеток на лунку для образца в 96-луночном планшете. Неконъюгированное исследуемое антитело добавляют на пластину в концентрациях от 0 до 50 мкг/мл (трехкратное титрование, начиная с максимальной концентрации 50 мкг/мл). Можно использовать неродственный IgG в качестве изотипического контроля для исследуемого антитела и добавлять в тех же концентрациях (трехкратное титрование, начиная с максимальной концентрации 50 мкг/мл). Образец, предварительно инкубированный с немеченым эталонным антителом 50 мкг/мл, может быть включен в качестве положительного контроля для полного блокирования (100% ингибирование), а образец без антитела в первичной инкубации может быть использован в качестве отрицательного контроля (конкуренция отсутствует, 0% ингибирования). Через 30 мин инкубации меченое, например биотинилированное эталонное антитело, добавляют в концентрации 2 мкг/мл на лунку без отмывания. Образцы инкубируют еще 30 мин. Несвязанные антитела удаляют, промывая клетки FACS-буфером. Связанное с клеткой меченое эталонное антитело обнаруживают с помощью средства, которое обнаруживает метку, например конъюгированный с PE стрептавидин (Invitrogen, № в каталоге S21388) для обнаружения биотина. Сбор данных от образцов производят на проточном цитометре FACS Calibur (BD, San Jose) и анализируют с помощью программного обеспечения Flowjo (Tree Star, Inc, Ashland, OR). Результаты могут быть представлены как % ингибирования (т.е. вычитание из 100% количества метки при каждой концентрации, деленной на количество метки, полученное без блокирующего антитела).

Как правило, тот же эксперимент затем выполняют обратным образом, т.е. исследуемое антитело представляет собой эталонное антитело, а эталонное антитело представляет собой исследуемое антитело.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело по меньшей мере частично (например, по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90%) или полностью (100%) блокирует связывание другого антитела с мишенью, например, TIGIT человека или его фрагмента, и независимо от того, происходит ли ингибирование, когда одно или другое антитело представляет собой исследуемое антитело. Исследуемое и эталонное антитело "перекрестно блокируют" связывание друг друга с мишенью, когда антитела конкурируют друг с другом в обоих направлениях, т.е. в конкурентных экспериментах, в которые сначала добавляют исследуемое антитело, и в конкурентных экспериментах, в которых эталонное антитело добавляют первым.

Считается, что антитела к huTIGIT конкурируют с раскрытыми в настоящем документе антителами к huTIGIT, если они ингибируют связывание 15A6 и/или 22G2 с TIGIT человека по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100%, когда присутствуют приблизительно в одинаковых концентрациях, например, в конкурентных экспериментах, подобных описанным в примере 3. Если не указано иное, считается, что антитело конкурирует с антителом, выбранным из группы, состоящей из антител к huTIGIT по настоящему изобретению, если оно уменьшает связывание выбранного антитела с TIGIT человека по меньшей мере на 20% при использовании в приблизительно равной молярной концентрации с выбранным антителом, как измерено в конкурентных экспериментах с помощью ИФА, как указано в предыдущих двух параграфах.

Антитела к TIGIT, которые связываются с одним и тем же эпитопом.

Антитела к huTIGIT, которые связываются с теми же или сходными эпитопами с раскрытыми в настоящем документе антителами, могут быть получены с использованием протоколов иммунизации, аналогичных описанным в настоящем документе (пример 1). Полученные антитела могут быть подвергнуты скринингу на высокоаффинное связывание с TIGIT человека (пример 2). Затем выбранные антитела могут быть изучены в анализе дрожжевого дисплея, в котором варианты последовательности huTIGIT представлены на поверхности дрожжевых клеток (пример 4) для определения точного эпитопа, связанного антителом.

Определения эпитопов могут быть сделаны любым способом, известным в настоящей области техники. Раскрытые в настоящем документе эпитопы определяли с помощью дрожжевого дисплея, как описано в примере 4 и представлено на фиг. 2A-2C. Согласно различным вариантам осуществления считается, что антитела к huTIGIT связываются с тем же эпитопом, что и описанное в настоящем документе моноклональное антитело к huTIGIT, например 15A6 и/или 22G2, если они контактируют с одним или несколькими одинаковыми остатками в пределах по меньшей мере одной области huTIGIT, контактирующей с 15A6 или 22G2; если они контактируют с большинством остатков в пределах по меньшей мере одной области huTIGIT, контактирующей с 15A6 или 22G2; если они контактируют с большинством остатков в каждой области huTIGIT, контактирующей с 15A6 или 22G2; если они контактируют с большинством контактов по всей длине huTIGIT, контактирующей с 15A6 или 22G2; если они создают контакты во всех отдельных областях TIGIT человека, контактирующих с 15A6 или 22G2; если они контактируют со всеми одинаковыми остатками в какой-либо одной области на TIGIT человека, контактирующей с 15A6 или 22G2; или если они контактируют со всеми остатками во всех областях, контактирующих с 15A6 или 22G2. Эпитопные "области" представляют собой кластеры остатков вдоль первичной последовательности, которые контактируют с антителами 15A6 или 22G2, например, как представлено в SEQ ID NO: 38-44.

Техники определения антител, которые связываются с "тем же эпитопом на TIGIT", что и описанные в настоящем документе антитела, включают в себя рентгенографический анализ кристаллов комплексов антиген: антитело, который обеспечивает атомное разрешение эпитопа. Другие способы контролируют связывание антитела с фрагментами антигена или мутированными вариациями антигена, где потеря связывания вследствие модификации аминокислотного остатка в антигенной последовательности считается показателем компонента эпитопа. Способы могут также полагаться на способность представляющего интерес антитела к аффинности к выделенным специфическим коротким пептидам (как в нативной трехмерной форме, так и в денатурированной форме) из комбинаторных пептидных библиотек фагового дисплея или из протеазного расщепления белка-мишени. Затем пептиды рассматриваются как проводники для определения эпитопа, соответствующего антителу, используемому для скрининга библиотеки пептидов. Для картирования эпитопов также были разработаны вычислительные алгоритмы, которые, как было показано, отображают конформационные прерывистые эпитопы.

Эпитоп или область, содержащая эпитоп, также могут быть идентифицированы путем скрининга на связывание с рядом перекрывающихся пептидов, охватывающих TIGIT. Альтернативно, может использоваться способ Jespers et al. (1994) *Biotechnology* 12:899 для направления отбора антител, содержащих один и тот же эпитоп, и, следовательно, характеризующихся подобными свойствами с описанными в настоящем документе антителами к TIGIT. Используя фаговый дисплей, сначала тяжелую цепь антитела к TIGIT объединяют в пары с репертуаром (предпочтительно человека) легких цепей для выбора связывающего TIGIT антитела, а затем новую легкую цепь соединяют с репертуаром (предпочтительно человека) тяжелых цепей для выбора (предпочтительно человеческого) связывающего TIGIT антитела, содержащего тот же эпитоп или область эпитопа, что и описанное в настоящем документе антитело к

huTIGIT. Альтернативно варианты описанного в настоящем документе антитела могут быть получены посредством мутагенеза кДНК, кодирующей тяжелую и легкую цепи антитела.

Также может быть использован сканирующий аланином мутагенез, описанный Cunningham & Wells (1989) *Science* 244: 1081, или какая-либо другая форма точечного мутагенеза аминокислотных остатков в TIGIT (например, способ дрожжевого дисплея, представленный в примере 4) для определения функционального эпитопа для антитела к TIGIT.

Эпитоп или область эпитопа ("область эпитопа" представляет собой область, содержащую эпитоп или перекрывающуюся с эпитопом), связанная определенным антителом, также может быть определена путем оценки связывания антитела с пептидами, содержащими фрагменты TIGIT. Ряд перекрывающихся пептидов, охватывающих последовательность TIGIT (например, человеческий TIGIT), может быть синтезирован и подвергнут скринингу на предмет связывания, например, в прямом ИФА, конкурентном ИФА (где пептид оценивается на его способность предотвращать связывание антитела с TIGIT, связанным с лункой планшета для микротитрования) или на чипе. Такие способы скрининга пептидов могут быть не способны обнаруживать некоторые прерывистые функциональные эпитопы, т.е. функциональные эпитопы, которые включают в себя аминокислотные остатки, которые не смежны вдоль первичной последовательности полипептидной цепи TIGIT.

Эпитоп также может быть идентифицирован с помощью основанного на масс-спектрометрии футпринтинге белков, например водород/дейтериевой обменной масс-спектрометрии (HDX-MS) и быстром фотохимическом окислении белков (FPOP). HDX-MS может быть проведена, например, как далее описано в Wei et al. (2014) *Drug Discovery Today* 19:95, способы которой специально включены в настоящий документ посредством ссылки. FPOP может проводиться, как описано, например, в Hambley & Gross (2005) *J. American Soc. Mass Spectrometry* 16:2057, способы которого конкретно включены в настоящий документ посредством ссылки.

Эпитоп, связанный антителами к TIGIT, также может быть определен структурными способами, такими как определение кристаллической структуры рентгеновским излучением (например, WO 2005/044853), молекулярное моделирование и спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР), включая в себя определение посредством ЯМР скорости H-D обменов лабильных амидных водородов в TIGIT, когда они свободны и связаны в комплексе с интересующим антителом (Zinn-Justin et al. (1992) *Biochemistry* 31:11335; Zinn-Justin et al. (1993) *Biochemistry* 32:6884).

Что касается рентгеновской кристаллографии, кристаллизация может быть выполнена с использованием любого из известных способов в настоящей области техники (например, Giege et al. (1994) *Acta Crystallogr.* D50:339; McPherson (1990) *Eur. J. Biochem.* 189:1), включая микросерию (например, Chayen (1997) *Structure* 5:1269), способа висячей капли посредством диффузии в парах (например, McPherson (1976) *J. Biol. Chem.* 251:6300), посев и диализ. Желательно использовать белковый препарат с концентрацией по меньшей мере приблизительно 1 мг/мл и предпочтительно от приблизительно 10 мг/мл до приблизительно 20 мг/мл. Кристаллизация может быть наилучшим образом достигнута в растворе осадителя, содержащем полиэтиленгликоль 1000-20000 (ПЭГ, средняя молекулярная масса от приблизительно 1000 до приблизительно 20000 Да), предпочтительно от приблизительно 5000 до приблизительно 7000 Да, более предпочтительно приблизительно 6000 Да, с диапазоном концентраций от приблизительно 10 до 30% (мас./об.). Также может быть желательным включать стабилизирующее белок средство, например, глицерин в диапазоне концентраций от приблизительно 0,5% до приблизительно 20%. Подходящая соль, такая как хлорид натрия, хлорид лития или цитрат натрия, также может быть желательной в растворе осадителя, предпочтительно в концентрации от приблизительно 1 мМ до приблизительно 1000 мМ. Осадок предпочтительно забуферивают до pH от приблизительно 3,0 до приблизительно 5,0, предпочтительно приблизительно 4,0. Специфические буферы, применимые в растворе осадителя, могут варьировать и хорошо известны в настоящей области техники (Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Third ed., (1994) Springer-Verlag, New York). Примеры применимых буферов включают в себя, без ограничения, HEPES, Tris, MES и ацетат. Кристаллы могут расти в широком диапазоне температур, включая в себя 2, 4, 8 и 26°C.

Кристаллы антитело:антиген могут быть изучены с использованием хорошо известных способов дифракции рентгеновских лучей и могут быть усовершенствованы с использованием компьютерного программного обеспечения, такого как X-PLOR (Yale University, 1992, distributed by Molecular Simulations, Inc.; см., например, Blundell & Johnson (1985) *Meth. Enzymol.* 114 & 115, H. W. Wyckoff et al., eds., Academic Press, публикацию заявки на патент США № 2004/0014194) и BUSTER (Bricogne (1993) *Acta Cryst.* D49: 37-60; Bricogne (1997) *Meth. Enzymol.* 276A: 361-423, Carter & Sweet, eds.; Roversi et al. (2000) *Acta Cryst.* D56:1313-1323), раскрытие которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

Антитела к TIGIT, которые связываются с высокой аффинностью.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела к huTIGIT по настоящему изобретению связываются с huTIGIT с высокой аффинностью, как и раскрытые в настоящем документе антитела к huTIGIT, увеличивая вероятность того, что они представляют собой эффективные терапевтические средства. Согласно различным вариантам осуществления антитела к huTIGIT по настоящему изобретению

связываются с huTIGIT с K_D менее чем 10, 5, 2, 1 нМ, 300, 100 или 60 пМ. Согласно другим вариантам осуществления антитела к huTIGIT по настоящему изобретению связываются с huTIGIT с K_D от 2 нМ до 60 пМ. Стандартные анализы для оценки связывающей способности антител к huTIGIT включают в себя ИФА, радиоиммуноанализ, Вестерн-блоттинг, биослойную интерферометрию (BLI) и BIACORE® SPR (смотрите пример 2).

Варианты последовательностей антител к TIGIT.

Некоторая изменчивость в последовательностях раскрытых в настоящем документе антител может переноситься и все еще поддерживать желаемые свойства антитела. Области CDR очерчиваются с использованием системы Kabat (Kabat E.A. et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication № 91-3242). Соответственно, в настоящем изобретении дополнительно предусмотрены антитела к huTIGIT, содержащие последовательности CDR, которые по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичны CDR-последовательности описанных в настоящем документе антител (например, 15A6, 22G2 и 11G11). В настоящем изобретении также предусмотрены антитела к huTIGIT, содержащие последовательности вариабельного домена тяжелой и/или легкой цепи, которые по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичны последовательностям вариабельного домена тяжелой и/или легкой цепей описанных в настоящем документе антител (например, 15A6, 22G2 и 11G11).

Антитела к TIGIT, полученные из тех же зародышевых линий.

Учитывая, что антигенсвязывающая специфичность определяется в основном CDR, антитела, содержащие те же последовательности CDR, что и описанные в настоящем документе антитела (например, 15A6, 22G2 и 11G11), вероятно, будут характеризоваться теми же желательными свойствами. Кроме того, выбранные описанные в настоящем документе антитела (15A6, 22G2 и 11G11), связываются с подобными областями вдоль первичной последовательности huTIGIT, а некоторые тяжелые и легкие цепи получают из тех же последовательностей зародышевой линии. Соответственно, можно ожидать, что антитела, объединяющие ("смешивающие и подбирающие в пары") области CDR из антител с 15A6, 22G2 и 11G11, могут связываться с huTIGIT и сохранять желаемые свойства. "Смешанные и подобранные в пары" антитела, характеризующиеся аффинностью связывания, биологической активностью и/или другими свойствами, эквивалентными или превосходящими раскрытые в настоящем документе специфические антитела, могут быть выбраны для использования в способах по настоящему изобретению.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитела к huTIGIT по настоящему изобретению содержат вариабельную область тяжелой цепи, полученную от определенного гена тяжелой цепи иммуноглобулина зародышевой линии человека, и/или вариабельную область легкой цепи от определенного гена легкой цепи иммуноглобулина зародышевой линии человека. Антитело 15A6 содержит тяжелую цепь, полученную из V4-39, D6-19 и JH4b зародышевых линий человека, и легкую цепь VA27 и JK2 зародышевых линий. Антитело 22G2 содержит тяжелую цепь, полученную из V4-61, D3-10 и JH6b зародышевых линий человека, и легкую цепь VL6 и JK3 зародышевых линий. Антитело 11G11 содержит тяжелую цепь, полученную из V4-39, D3-10 и JH4b зародышевых линий человека, и легкую цепь VL6 и JK2 зародышевых линий. Антитело 10D7 содержит тяжелую цепь, полученную из VI-69, D6-13 и JH6b зародышевых линий человека и легкую цепь VL15 и JK5 зародышевых линий. Другие антитела, которые связываются с TIGIT человека и происходящие от некоторых или всех этих последовательностей зародышевой линии, вероятно, будут тесно связаны в последовательности, в частности, те, которые получены из тех же генов V-области, и, следовательно, ожидается, что они будут обладать теми же желательными свойствами.

Как используется в настоящем документе, человеческое антитело содержит вариабельные области тяжелой или легкой цепи, которые "происходят от" конкретной последовательности зародышевой линии, если вариабельные области антитела получены из системы, которая использует гены иммуноглобулина зародышевой линии человека, и последовательность антител достаточно связана с зародышевой линией, что она, скорее всего, происходит от данной зародышевой линии, чем из любой другой. Такие системы включают в себя иммунизацию трансгенной мыши, несущей гены человеческого иммуноглобулина с представляющим интерес антигеном, или скрининг библиотеки генов иммуноглобулина человека, отображаемой на фаге с представляющим интерес антигеном. Последовательность(и) иммуноглобулина зародышевой линии человека, от которой антитело "происходит", можно идентифицировать путем сравнения аминокислотной последовательности человеческого антитела с аминокислотными последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии человека и отбора последовательности иммуноглобулина зародышевой линии человека, которая представляет собой наиболее близкую по последовательности (т.е. наибольший % идентичности) к последовательности человеческого антитела. Человеческое антитело, которое "происходит от" конкретной последовательности иммуноглобулина зародышевой линии человека, может содержать различия в аминокислотах по сравнению с последовательностью зародышевой линии, например, из-за естественных соматических мутаций или преднамеренного введения сайт-направленной мутации. Однако выбранное человеческое антитело, как правило, по меньшей мере на 90% идентично по аминокислотной последовательности аминокислотной последовательности, кодируемой геном иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, V области), и содержит аминокислотные

остатки, которые идентифицируют человеческое антитело как человеческое по сравнению с аминокислотными последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии других видов (например, последовательностями зародышевой линии мыши). В некоторых случаях человеческое антитело может быть по меньшей мере на 95% или даже по меньшей мере на 96, 97, 98 или 99% идентично по аминокислотной последовательности аминокислотной последовательности, кодируемой геном иммуноглобулина зародышевой линии (например, V-области). Как правило, человеческое антитело, происходящее от конкретной последовательности зародышевой линии человека, будет отображать не более 10 аминокислотных различий от аминокислотной последовательности, кодируемой геном иммуноглобулина человеческой линии (например, V-областей). В некоторых случаях человеческое антитело может отображать не более 5 или даже не более 4, 3, 2 или 1 аминокислотного различия от аминокислотной последовательности, кодируемой геном иммуноглобулина зародышевой линии (например, V-областей).

II. Сконструированные и модифицированные антитела.

Области V_H и V_L.

Также предусмотрены сконструированные и модифицированные антитела, которые могут быть получены с использованием антитела, содержащего одну или несколько раскрытых в настоящем документе последовательностей V_H и/или V_L в качестве исходного материала, для конструирования модифицированного антитела, причем модифицированное антитело может характеризоваться измененными относительно исходного антитела свойствами. Антитело может быть сконструировано путем модификации одного или нескольких остатков в одной или обеих переменных областях (т.е. V_H и/или V_L), например, в пределах одной или нескольких областей CDR и/или одной или нескольких каркасных областей. Дополнительно или альтернативно, антитело может быть сконструировано путем модификации остатков в пределах константной области(ей), например, для изменения эффекторной функции(й) антитела.

Один тип конструирования переменной области, который может быть выполнен, - это трансплантация CDR. Такая трансплантация особенно применима для гуманизации отличных от человеческих антител к TIGIT, которые конкурируют за связывание с описанными в настоящем документе антителами к huTIGIT и/или связываются с тем же эпитопом, что и описанные в настоящем документе антитела к huTIGIT. Антитела взаимодействуют с антигенами-мишенями преимущественно через аминокислотные остатки, которые расположены в шести определяющих комплементарность областях (CDR) тяжелых и легких цепей. По этой причине аминокислотные последовательности в CDR больше отличаются между отдельными антителами, чем последовательности вне CDR. Поскольку последовательности CDR ответственны за большинство взаимодействий антитело-антиген, можно экспрессировать рекомбинантные антитела, которые имитируют свойства специфических эталонных антител, путем конструирования экспрессирующих векторов, которые включают в себя последовательности CDR из специфического эталонного антитела, привитого на каркасные последовательности из другого антитела с другими свойствами (см., например, Riechmann L. et al. (1998) *Nature* 332:323-327; Jones P. et al. (1986) *Nature* 321:522-525; Queen C. et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:10029-10033, патент США № 5225539 на имя Winter и патенты США № 5530101, 5558589, 5697662 и 6880370 на имя Queen et al.).

Такие каркасные последовательности могут быть получены из общедоступных баз данных ДНК или опубликованных ссылок, которые включают в себя последовательности генов антител зародышевой линии. Например, последовательности ДНК зародышевой линии для генов переменной области тяжелой и легкой цепи человека можно найти в базе данных последовательностей зародышевой линии человека "VBase", а также в Kabat E.A. et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson I.M. et al. (1992) "The Repertoire of Human Germline V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of Vh Segments with Different Hypervariable Loops" *J. Mol. Biol.* 227:776-798 и Cox J.P.L. et al. (1994) "A Directory of Human Germ-line V_H Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" *Eur. J. Immunol.* 24:827-836; содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Предпочтительные каркасные последовательности для использования в описанных в настоящем документе антителах представляют собой такие, которые структурно подобны каркасным последовательностям, используемым описанными в настоящем документе антителами. Последовательности 2 и 3 CDR1 V_H и последовательности 2 и 3 CDR1 V_L могут быть привиты на каркасные области, которые содержат идентичную последовательность, подобную последовательности гена иммуноглобулина зародышевой линии, из которой получают каркасную последовательность, или последовательности CDR могут быть привиты на каркасные области, которые содержат до 20 предпочтительно консервативных аминокислотных замен по сравнению с последовательностями зародышевой линии. Например, было обнаружено, что в некоторых случаях полезно наличие мутированных остатков в каркасных областях для поддержания или усиления антигенсвязывающей способности антитела (см., например, патенты США № 5530101, 5585089, 5697662 и 6280370 на имя Queen et al.).

Описанные в настоящем документе сконструированные антитела включают в себя те, в которых были внесены модификации в каркасные остатки в пределах V_H и/или V_L, например, для улучшения свойств антитела. Часто такие модификации каркаса производят для уменьшения иммуногенности антитела. Например, один подход заключается в том, чтобы "мутировать к первоначальному виду" один или

несколько остатков каркаса до соответствующей последовательности зародышевой линии. Более конкретно, антитело, которое подверглось соматической мутации, может содержать каркасные остатки, которые отличаются от последовательности зародышевой линии, из которой получено антитело. Такие остатки можно идентифицировать путем сравнения последовательностей каркаса антитела с последовательностями зародышевой линии, из которых получено антитело. Чтобы вернуть последовательности каркасных областей в их конфигурацию зародышевой линии, соматические мутации могут быть "мутированы к первоначальному виду" до последовательности зародышевой линии, например, путем сайт-направленного мутагенеза или опосредуемого ПЦР мутагенеза. Такие "мутировавшие к первоначальному виду" антитела также предназначены для охвата.

Другой тип модификации каркаса включает в себя мутирование одного или нескольких остатков в каркасной области или даже в пределах одной или нескольких областей CDR для удаления эпитопов Т-клеток, чтобы таким образом уменьшить потенциальную иммуногенность антитела. Этот подход также упоминается как "деиммунизация" и более подробно описан в публикации патента США № 20030153043 на имя Сагг et al.

Другим типом модификации вариабельной области является мутация аминокислотных остатков в областях CDR для улучшения одного или нескольких связывающих свойств (например, аффинности) представляющего интерес антитела. Сайт-направленный мутагенез или ПЦР-опосредованный мутагенез может быть выполнен для введения мутации(й) и влияния на связывание антител или другого интересующего функционального свойства. Предпочтительно вводятся консервативные модификации. Мутации могут представлять собой аминокислотные добавления, делеции или, предпочтительно, замены. Кроме того, как правило, изменяется не более одного, двух, трех, четырех или пяти остатков в области CDR.

Метиониновые остатки в CDR антител могут быть окислены, что приводит к потенциальной химической деградации и последующему снижению эффективности антитела. Соответственно, также предусмотрены антитела к TIGIT, которые содержат один или несколько остатков метионина в CDR тяжелых и/или легких цепей, замененных аминокислотными остатками, которые не подвергаются окислительной деградации.

Аналогичным образом сайты дезамидирования могут быть удалены из антител к TIGIT, особенно в CDR.

Потенциальные сайты гликозилирования в антигенсвязывающем домене предпочтительно удаляются, чтобы предотвратить гликозилирование, которое может препятствовать связыванию антигена. См., например, патент США № 5714350.

Нацеленное связывание антигена.

Согласно различным вариантам осуществления антитело по настоящему изобретению модифицируют для избирательного блокирования связывания антигена в тканях и средах, где связывание антигена было бы вредным, но позволяло связывать антиген, где это было бы полезно. Согласно одному варианту осуществления производят блокирующую "маску" пептида, которая специфически связывается с антигенсвязывающей поверхностью антитела и препятствует связыванию с антигеном, причем эта маска связана с каждым из связующих плечей антитела с помощью расщепляемого линкера пептидазы. См., например, патент США № 8518404 на имя CytomX. Такие конструкции применимы для лечения злокачественных опухолей, при которых уровни протеазы значительно увеличиваются в микроокружении опухоли по сравнению с неопухолевыми тканями. Селективное расщепление расщепляемого линкера в микроокружении опухоли делает возможной диссоциацию маскирующего/блокирующего пептида, что обеспечивает селективное связывание антигена в опухоли, а не в периферических тканях, в которых связывание антигена может вызвать нежелательные побочные эффекты.

Альтернативно, согласно соответствующему варианту осуществления вырабатывается бивалентное связывающее соединение ("маскирующий лиганд"), содержащее два антигенсвязывающих домена, которые связываются с обеими антигенсвязывающими поверхностями (бивалентного) антитела и препятствуют связыванию с антигеном, в котором две маски связывающих доменов связаны друг с другом (но не с антителом) расщепляемым линкером, например, расщепляемым пептидазой. См., например, публикацию международной заявки на патент № WO 2010/077643 на имя Tegopharm Corp. Маскирующие лиганды могут содержать или происходить от антигена, с которым предназначено связывание антитела, или могут быть образованы независимо. Такие маскирующие лиганды применимы для лечения злокачественных опухолей, при которых уровни протеазы значительно увеличиваются в микроокружении опухоли по сравнению с неопухолевыми тканями. Селективное расщепление расщепляемого линкера в микроокружении опухоли позволяет диссоциировать двум связывающим доменам друг от друга, уменьшая avidность для антигенсвязывающих поверхностей антитела. Полученная диссоциация маскирующего лиганда от антитела позволяет селективно связывать антиген в опухоли, а не в периферических тканях, в которых связывание антигена может вызвать нежелательные побочные эффекты.

Fc и модифицированные Fc.

В дополнение к активности терапевтического антитела, возникающего в результате связывания антигенсвязывающего домена с антигеном (например, блокирования родственного лиганда или рецептор-

ного белка в случае антител-антагонистов или индуцированной передачи сигналов в случае антител-агонистов), часть Fc антитела взаимодействует с иммунной системой, как правило, сложными способами, чтобы вызвать любое количество биологических эффектов. Эффекторные функции, такие как область Fc иммуноглобулина, ответственны за многие важные функции антител, такие как антигензависимая клеточная цитотоксичность (ADCC), комплементзависимая цитотоксичность (CDC) и антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз (ADCP), приводя в результате к уничтожению клеток-мишеней, хотя и разными механизмами. Существует пять основных классов или изоформ константной области тяжелой цепи (IgA, IgG, IgD, IgE, IgM), каждая с характеристическими эффекторными функциями. Эти изоформы можно дополнительно подразделить на подклассы, например, IgG разделяют на четыре подкласса, известные как IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Молекулы IgG взаимодействуют с тремя классами Fcγ-рецепторов (FcγR), специфичных для антител класса IgG, а именно FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Сообщалось, что важные последовательности для связывания IgG с рецепторами FcγR находятся в доменах CH2 и CH3. Период полужизни в сыворотке крови антитела зависит от способности этого антитела связываться с неонатальным Fc-рецептором (FcRn).

Антитела согласно настоящему изобретению могут содержать вариабельные домены по настоящему изобретению в сочетании с константными доменами, содержащими различные Fc-области, выбранные на основе биологической активности (если таковые имеются) антитела для предполагаемого использования. Salfeld (2007) *Nat. Biotechnol.* 25:1369. Например, человеческие IgG можно разделить на четыре подкласса: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, и каждый из них содержит область Fc, характеризующуюся уникальным профилем для связывания с одним или несколькими рецепторами Fcγ (активирующие рецепторы FcγRI (CD64), FcγRIIA, FcγRIIC (CD32), FcγRIIIA и FcγRIIIB (CD16) и ингибирующий рецептор FcγRIIIB) и для первого компонента комплемента (C1q). IgG1 и IgG3 человека связываются со всеми рецепторами Fcγ; IgG2 связывается с FcγRIIA_{H131} и с более низкой аффинностью с FcγRIIA_{R131}; FcγRIIA_{V158}; IgG4 связывается с FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIC и FcγRIIA_{V158}; и ингибирующий рецептор FcγRIIIB характеризуется более низкой аффинностью к IgG1, IgG2 и IgG3, чем все другие рецепторы Fcγ. Bruhns et al. (2009) *Blood* 113:3716. Исследования показали, что FcγRI не связывается с IgG2, а FcγRIIIB не связывается с IgG2 или IgG4. В общем, что касается активности ADCC, человеческий

$$\text{IgG1} \geq \text{IgG3} \gg \text{IgG4} \geq \text{IgG2}$$

Как следствие, например, константный домен IgG1, а не IgG2 или IgG4, может быть выбран для использования в лекарственном средстве, где желательно ADCC; IgG3 может быть выбран, если нужно активировать экспрессирующие FcγRIIIA NK-клетки, моноциты и макрофаги; и IgG4 может быть выбран, если антитело должно использоваться для десенсибилизации пациентов с аллергией. IgG4 также может быть выбран, если желательно, чтобы у антитела отсутствовала вся эффекторная функция.

Описанные в настоящем документе вариабельные области TIGIT могут быть связаны (например, ковалентно связаны или слиты) с Fc, например, Fc IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, которые могут быть любого аллотипа или изоаллотипа, например, для IgG1: G1m, G1m1(a), G1m2(x), G1m3(f), G1m17(z); для IgG2: G2m, G2m23(n); для IgG3: G3m, G3m21(g1), G3m28(g5), G3m11(b0), G3m5(b1), G3m13(b3), G3m14(b4), G3m10(b5), G3m15(s), G3m16(t) G3m6(c3), G3m24(c5), G3m26(u), G3m27(v). См., например, Jefferis et al. (2009) *mAbs* 1:1. На выбор аллотипа могут влиять потенциальные проблемы иммуногенности, например, чтобы свести к минимуму образование антител к лекарственным средствам.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе вариабельные области к TIGIT связаны с Fc, который связывается с одним или несколькими активирующими Fc-рецепторами (FcγRI/CD64, FcγRIIA/CD32 или FcγRIIIA/CD16) и тем самым стимулирует ADCC и может вызывать истощение T-клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе вариабельные области к TIGIT связаны с Fc IgG1 или IgG3 человека, т.е. антитела характеризуются изоформой IgG1 или IgG3. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела к TIGIT представляют собой истощающие антитела, в частности они истощают клетки T_{reg}, но не клетки T_{eff}, в опухолевом микроокружении (и тем самым усиливают противоопухолевую активность), но не значительно истощают клетки T_{reg} и T_{eff} за пределами опухолевого микроокружения, например на периферии. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела к TIGIT характеризуются изоформой, либо встречающимся в природе, либо не встречающимся в природе (например, включая в себя мутацию(и)), которые стимулируют истощение или элиминацию клеток T_{reg} в опухолевом сайте и сопутствующую активацию клеток T_{eff}. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела к TIGIT создают повышенное отношение T_{eff} к T_{reg} в опухолевом сайте, что указывает на сильную противоопухолевую активность, предпочтительно без значительного истощения клеток T_{reg} и T_{eff}, которые находятся вне опухолевого микроокружения, например, на периферии.

Согласно другим вариантам осуществления антитела к TIGIT блокируют иммуносупрессивную активность T_{reg}. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела к TIGIT содержат Fc с уменьшенным или исключенным связыванием FcR, например, с уменьшенным связыванием с активирующими FcR.

Описанные в настоящем документе вариабельные области TIGIT могут быть связаны с не встречающейся в природе Fc-областью, например с эффекторной функцией или, главным образом, лишенной

эффекторной функции Fc (например, человеческим IgG2 или IgG4) или, альтернативно, Fc с улучшенным связыванием с одним или несколькими активирующими Fc-рецепторами (FcγRI, FcγRIIa или FcγRIIIa), например, для улучшения истощения T_{reg} в окружающей опухоли среде.

Описанные в настоящем документе переменные области могут быть связаны с Fc, содержащей одну или несколько модификаций, как правило, для изменения одного или нескольких функциональных свойств антитела, таких как период полужизни в сыворотке, фиксация комплемента, связывание Fc-рецептора и/или антигензависимая клеточная цитотоксичность. Кроме того, описанное в настоящем документе антитело может быть химически модифицировано (например, один или несколько химических фрагментов могут быть присоединены к антителу) или его можно модифицировать, чтобы изменить его гликозилирование, чтобы изменить одно или несколько функциональных свойств антитела. Каждый из этих вариантов осуществления более подробно описан ниже. Нумерация остатков в области Fc относится к индексу EU Kabat. Раскрытые в настоящем документе варианты последовательностей представлены со ссылкой на количество остатков, за которым следует аминокислота, которая замещает природную аминокислоту, необязательно предшествующую природному остатку в этом положении. Если в данном положении могут присутствовать несколько аминокислот, например, если последовательности различаются между встречающимися в природе изоформами, или если несколько мутаций могут быть замещены в положении, они разделяются косой чертой (например, "X/Y/Z").

Например, можно сделать модификации в области Fc, чтобы получить вариант Fc с (a) повышенной или сниженной антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичностью (ADCC), (b) повышенной или сниженной комплементарной цитотоксичностью (CDC), (c) повышенной или сниженной аффинностью к Clq и/или (d) повышенной или сниженной аффинностью к Fc-рецептору относительно исходной Fc. Такие варианты области Fc, как правило, содержат по меньшей мере одну аминокислотную модификацию в области Fc. Считается, что сочетание аминокислотных модификаций является особенно желательным. Например, вариант области Fc может включать в себя два, три, четыре, пять и т.д. замещений в ней, например, определенных положений области Fc, указанных в настоящем документе. Иллюстративные варианты последовательности Fc раскрыты в настоящем документе и также представлены в патентах США № 5624821; 6277375; 6737056; 6194551; 7317091; 8101720; патентных публикациях PCT WO 00/42072; WO 01/58957; WO 04/016750; WO 04/029207; WO 04/035752; WO 04/074455; WO 04/099249; WO 04/063351; WO 05/070963; WO 05/040217, WO 05/092925 и WO 06/020114.

Снижение эффекторной функции.

Активность ADCC может быть снижена путем модификации области Fc. Согласно некоторым вариантам осуществления сайты, которые влияют на связывание с Fc-рецепторами, могут быть удалены, предпочтительно сайты, отличные от сайтов связывания рецепторов реутилизации. Согласно другим вариантам осуществления область Fc может быть модифицирована для удаления сайта ADCC. Сайты ADCC известны в настоящей области техники; см., например, Sarmay et al. (1992), *Molec. Immunol.* 29 (5): 633-9 в отношении сайтов ADCC в IgG1. Согласно одному варианту осуществления вариант G236R и L328R человеческого IgG1 эффективно устраняет связывание FcγR. Horton et al. (2011) *J. Immunol.* 186:4223 and Chu et al. (2008) *Mol. Immunol.* 45:3926. Согласно другим вариантам осуществления Fc, характеризующаяся уменьшенным связыванием с FcγR, содержала аминокислотные замещения L234A, L235E и G237A. Gross et al. (2001) *Immunity* 15:289.

Активность CDC также может быть снижена путем модификации области Fc. Мутации в положениях D270, K322, P329 и P331 IgG1, в частности аланиновые мутации D270A, K322A, P329A и P331A, значительно снижают способность соответствующего антитела связывать Clq и активировать комплемент. Idusogie et al. (2000) *J. Immunol.* 164:4178; публикация международной заявки WO 99/51642. Показано, что модификация положения 331 в IgG1 (например, P331S) снижает связывание комплемента. Тао et al. (1993) *J. Exp. Med.* 178:661 и Canfield & Morrison (1991) *J. Exp. Med.* 173:1483. В другом примере один или несколько аминокислотных остатков в положениях аминокислот с 231 по 239 изменены таким образом, чтобы уменьшить способность антитела фиксировать комплемент. Публикация международной заявки WO 94/29351.

Согласно некоторым вариантам осуществления Fc со сниженной комплементарной фиксацией содержит аминокислотные замены A330S и P331S. Gross et al. (2001) *Immunity* 15:289.

Для применений, в которых эффекторную функцию следует избегать вообще, например, когда только антигенное связывание является достаточным для получения желаемого терапевтического эффекта, а эффекторная функция приводит только (или увеличивает риск) к нежелательным побочным эффектам, могут быть использованы антитела IgG4 или антитела или фрагменты, лишённые области Fc или их существенной части, или Fc может быть мутирована для полного устранения гликозилирования (например, N297A). Альтернативно, была получена гибридная конструкция человеческого IgG2 (домен C_{H1} и шарнирная область) и человеческого IgG4 (домены C_{H2} и C_{H3}), которая лишена эффекторной функции, не способна связываться с FcγR (подобно IgG2) и не способна активировать комплемент (подобно IgG4). Rother et al. (2007) *Nat. Biotechnol.* 25:1256. См. также Mueller et al. (1997) *Mol. Immunol.* 34:441; Labrijn et al. (2008) *Curr. Op. Immunol.* 20:479 (обсуждение модификаций Fc для снижения эффекторной функции в целом).

Согласно другим вариантам осуществления область Fc изменяют путем замены по меньшей мере одного аминокислотного остатка другим аминокислотным остатком, чтобы уменьшить всю эффекторную функцию(и) антитела. Например, одна или несколько аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 и 322, могут быть заменены другим аминокислотным остатком, так чтобы антитело уменьшало аффинность к эффекторному лиганду, но сохраняло антигенсвязывающую способность исходного антитела. Эффекторный лиганд, к которому изменяется аффинность, может представлять собой, например, Fc-рецептор (остатки 234, 235, 236, 237, 297) или компонент C1 комплемента (остатки 297, 318, 320, 322). Патенты США № 5624821 и 5648260, оба на имя Winter et al.

В одной более ранней патентной заявке были предложены модификации в области Fc IgG для уменьшения связывания с FcγRI для снижения ADCC (234A; 235E; 236A; G237A) или блокирования связывания с компонентом C1q комплемента для устранения CDC (E318A или V/K320A и K322A/Q). Публикация международной заявки WO 88/007089. См. также Duncan & Winter (1988) Nature 332:563; Chappel et al. (1991) Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA) 88:9036 и Sondermann et al. (2000) Nature 406:267 (обсуждение влияния этих мутаций на связывание FcγRIII).

Модификации Fc, снижающие эффекторную функцию, также включают в себя замены, вставки и делеции в положениях 234, 235, 236, 237, 267, 269, 325 и 328, такие как 234G, 235G, 236R, 237K, 267R, 269R, 325L и 328R. Вариант Fc может содержать 236R/328R. Другие модификации для уменьшения взаимодействий FcγR и комплемента включают в себя замены 297A, 234A, 235A, 237A, 318A, 228P, 236E, 268Q, 309L, 330S, 331 S, 220S, 226S, 229S, 238S, 233P и 234V. Эти и другие модификации рассмотрены в Strohl (2009) Current Opinion in Biotechnology 20:685-691. Эффекторные функции (как ADCC, так и активация комплемента) могут быть снижены при сохранении связывания FcR новорожденных (поддержание периода полураспада) путем мутирования остатков IgG в одном или нескольких положениях 233-236 и 327-331, таких как E233P, L234V, L235A, необязательно G236A, A327G, A330S и P331S в IgG1; E233P, F234V, L235A, необязательно G236A в IgG4; и A330S и P331S в IgG2. См. Armour et al. (1999) Eur. J. Immunol. 29:2613; публикацию международной заявки WO 99/58572. Другие мутации, снижающие эффекторную функцию, включают в себя L234A и L235A в IgG1 (Alegre et al. (1994) Transplantation 57:1537); V234A и G237A в IgG2 (Cole et al. (1997) J. Immunol. 159:3613, смотрите также патент США № 5834597); и S228P и L235E для IgG4 (Reddy et al. (2000) J. Immunol. 164:1925). Другая комбинация мутаций для снижения эффекторной функции в человеческом IgG1 включает в себя L234F, L235E и P331S. Oganessian et al. (2008) Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 64:700. См., в общем, Labrijn et al. (2008) Curr. Op. Immunol. 20:479. Дополнительные мутации, обнаруженные для снижения эффекторной функции в контексте слитого белка Fc (IgG1) (абатацепт), представляют собой C226S, C229S и P238S (нумерация остатков EU). Davis et al. (2007) J. Immunol. 34:2204.

Другие варианты Fc, характеризующиеся сниженными ADCC и/или CDC, раскрыты в Glaesner et al. (2010) Diabetes Metab. Res. Rev. 26:287 (F234A и L235A для снижения ADCC и ADCP в IgG4); Hutchins et al. (1995) Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA) 92:11980 (F234A, G237A и E318A в IgG4); An et al. (2009) MAbs 1:572 и публикации заявки на патент США 2007/0148167 (H268Q, V309L, A330S и P331S в IgG2); McEarchern et al. (2007) Blood 109:1185 (C226S, C229S, E233P, L234V, L235A в IgG1); Vafa et al. (2014) Methods 65:114 (V234V, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S, P331S в IgG2).

Согласно некоторым вариантам осуществления выбирают Fc, которая, по существу, не характеризуется эффекторной функцией, т.е. характеризуется уменьшенным связыванием с FcγR и уменьшенной фиксацией комплемента. Иллюстративная Fc, например Fc IgG1, которая лишена эффекторной функции, содержит следующие пять мутаций: L234A, L235E, G237A, A330S и P331S. Gross et al. (2001) Immunity 15:289. Эти пять замен могут быть объединены с N297A для устранения гликозилирования.

Усиление эффекторной функции.

Альтернативно, активность ADCC может быть увеличена путем модификации области Fc. Что касается активности ADCC, человеческие

$$\text{IgG1} \geq \text{IgG3} \gg \text{IgG4} \geq \text{IgG2}$$

поэтому константный домен IgG1, а не IgG2 или IgG4, может быть выбран для применения в лекарственном средстве, где желательна ADCC. Альтернативно, область Fc может быть модифицирована для увеличения антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и/или для усиления аффинности к рецептору Fcγ путем модификации одной или нескольких аминокислот в следующих положениях: 234, 235, 236, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 262, 263, 264, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 299, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 313, 315, 320, 322, 324, 325, 326, 327, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 433, 434, 435, 436, 437, 438 или 439. См. публикацию международной заявки WO 2012/142515; см. также публикацию международной заявки WO 00/42072. Иллюстративные замены включают в себя 236A, 239D, 239E, 268D, 267E, 268E, 268F, 324T, 332D и 332E. Иллюстративные варианты включают в себя 239D-332E, 236A-332E, 236A-239D-332E, 268F-324T, 267E-268F, 267E-324T и 267E-268F-324T. Например, показано, что человеческие IgG1Fc, содержащие вариант G236A, который необязательно может быть объединен с I332E, увеличивают отношение аффинности

связывания FcγRIIA/FcγRIIB приблизительно в 15 раз. Richards et al. (2008) *Mol. Cancer Therap.* 7:2517; Moore et al. (2010) *mAbs* 2:181. Другие модификации для улучшения взаимодействий FcγR и компонента включают в себя, без ограничения, замены 298A, 333A, 334A, 326A, 247I, 339D, 339Q, 280H, 290S, 298D, 298V, 243L, 292P, 300L, 396L, 305I и 396L. Эти и другие модификации рассмотрены в Strohl (2009) *Current Opinion in Biotechnology* 20:685-691. В частности, как ADCC, так и CDC могут быть улучшены путем изменения в положении E333 в IgG1, например E333A. Shields et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591. Использование мутаций P247I и A339D/Q для усиления эффекторной функции в IgG1 описано в публикации международной заявки WO 2006/020114, а D280H, K290S ± S298D/V раскрыты в публикации международной заявки WO 2004/074455. Было показано, что варианты K326A/W и E333A/S повышают эффекторную функцию в человеческом IgG1 и E333S в IgG2. Idusogie et al. (2001) *J. Immunol.* 166:2571.

В частности, были описаны сайты связывания на IgG1 человека для FcγR1, FcγRII, FcγRIII и FcRn и описаны варианты с улучшенным связыванием. Shields et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604. Было показано, что специфические мутации в положениях 256, 290, 298, 333, 334 и 339 улучшают связывание с FcγRIII, включая в себя комбинированных мутантов T256A-S298A, S298A-E333A, S298A-K224A и S298A-E333A-K334A (с улучшенным связыванием FcγRIIIa и активностью ADCC). Были идентифицированы другие варианты IgG1 с сильно усиленным связыванием с FcγRIIIa, включая в себя варианты с мутациями S239D-I332E и S239D-I332E-A330L, которые показали наибольшее увеличение аффинности к FcγRIIIa, снижение связывания FcγRIIb и сильную цитотоксическую активность у яванских макаков. Lazar et al. (2006) *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)* 103:4005; Awan et al. (2010) *Blood* 115:1204; Desjarlais & Lazar (2011) *Exp. Cell Res.* 317:1278. Введение тройных мутаций в антитела, такие как алемтузумаб (CD52-специфический), трастузумаб (HER2/неу-специфический), ритуксимаб (CD20-специфический) и цетуксимаб (EGFR-специфический), приводило к значительно усиленной активности ADCC *in vitro*, и вариант S239D-I332E показал повышенную способность истощать В-клетки у обезьян. Lazar et al. (2006) *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)* 103:4005. Кроме того, были идентифицированы мутанты IgG1, содержащие мутации L235V, F243L, R292P, Y300L, V305I и P396L, которые проявляли усиленное связывание с FcγRIIIa и одновременно повышенную активность ADCC у трансгенных мышей, экспрессирующих FcγRIIIa человека на моделях злокачественных опухолей В-клеток и злокачественной опухоли молочной железы. Stavenhagen et al. (2007) *Cancer Res.* 67:8882; патент США № 8652466; Nordstrom et al. (2011) *Breast Cancer Res.* 13:R123.

Различные изоформы IgG также проявляют дифференциальную активность CDC (IgG3>IgG1>>IgG2≈IgG4). Dangl et al. (1988) *EMBO J.* 7:1989. Для применений, в которых желательна улучшенная CDC, можно также ввести мутации, которые увеличивают связывание с Clq. Возможность пополнения компонента (CDC) может быть усилена мутациями в K326 и/или E333 в IgG2, например K326W (что уменьшает активность ADCC) и E333S, чтобы увеличить связывание с Clq, первым компонентом каскада компонента. Idusogie et al. (2001) *J. Immunol.* 166:2571. Введение S267E/H268F/S324T (отдельно или в любой комбинации) в человеческий IgG1 усиливает связывание Clq. Moore et al. (2010) *mAbs* 2:181. Fc-область гибридного изоформа антитела IgG1/IgG3 "113F" Natsume et al. (2008) *Cancer Res.* 68:3863 (фиг. 1 в настоящем документе) также дает усиленную CDC. См. также Michaelsen et al. (2009) *Scand. J. Immunol.* 70:553 и Redpath et al. (1998) *Immunology* 93:595.

Дополнительные мутации, которые могут увеличивать или уменьшать эффекторную функцию, описаны в Dall'Acqua et al. (2006) *J. Immunol.* 177:1129. См. также Carter (2006) *Nat. Rev. Immunol.* 6:343; Presta (2008) *Curr. Opin. Immunol.* 20:460.

Хотя это необязательно имеет отношение к моноклональному антителу-антагонисту к TIGIT по настоящему изобретению, варианты Fc, которые усиливают аффинность к ингибирующему рецептору FcγRIIb, могут усиливать апоптоз-индуцирующую или адьювантную активность. Li & Ravetch (2011) *Science* 333:1030; Li & Ravetch (2012) *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)* 109:10966; публикация заявки на патент США 2014/0010812. Такие варианты могут обеспечивать антитело с иммуномодулирующей активностью, связанной с FcγRIIb⁺ клетками, включая в себя, например, В-клетки и моноциты. Согласно одному варианту осуществления варианты Fc обеспечивают избирательную усиленную аффинность к FcγRIIb относительно одного или нескольких активирующих рецепторов. Модификации для изменения связывания с FcγRIIb включают в себя одну или несколько модификаций в положении, выбранном из группы, состоящей из 234, 235, 236, 237, 239, 266, 267, 268, 325, 326, 327, 328 и 332, согласно EU. Иллюстративные замены для усиления аффинности FcγRIIb включают в себя, без ограничения, 234D, 234E, 234F, 234W, 235D, 235F, 235R, 235Y, 236D, 236N, 237D, 237N, 239D, 239E, 266M, 267D, 267E, 268D, 268E, 327D, 327E, 328F, 328W, 328Y и 332E. Иллюстративные замены включают в себя 235Y, 236D, 239D, 266M, 267E, 268D, 268E, 328F, 328W и 328Y. Другие варианты Fc для усиления связывания с FcγRIIb включают в себя 235Y-267E, 236D-267E, 239D-268D, 239D-267E, 267E-268D, 267E-268E и 267E-328F. В частности, варианты S267E, G236D, S239D, L328F и I332E, включая в себя двойной вариант S267E-L328F, человеческого IgG1, имеют особое значение для специфического усиления аффинности к ингибирующему рецептору FcγRIIb. Chu et al. (2008) *Mol. Immunol.* 45:3926; публикация заявки на патент США

2006/024298; публикация международной заявки WO 2012/087928. Повышенная специфичность для FcγRIIb (в отличие от FcγRIIa^{R131}) может быть получена путем добавления замены P238D и других мутаций (Mimoto et al (2013) *Protein. Eng. Des. & Selection* 26:589; публикация международной заявки WO 2012/115241), а также V262E и V264E (Yu et al. (2013) *J. Am. Chem. Soc.* 135:9723 и публикация международной заявки WO 2014/184545).

Удлинение периода полужизни.

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело модифицируют для увеличения его биологического периода полужизни. Возможны различные подходы. Например, это может быть сделано путем увеличения аффинности связывания области Fc для FcRn. Согласно одному варианту осуществления антитело изменяют в области CH1 или CL, чтобы содержать эпитоп, связывающий рецептор реутилизации, взятый из двух петель домена CH2 области Fc в IgG, как описано в патентах США № 5864046 и 6121202 на имя Presta et al и др. Другие иллюстративные варианты Fc, которые увеличивают связывание с FcRn и/или улучшают фармакокинетические свойства, включают в себя замещения в положениях 259, 308 и 434, включая в себя, например, 259I, 308F, 428L, 428M, 434S, 434H, 434F, 434Y и 434M. Другие варианты, которые усиливают связывание Fc с FcRn, включают в себя: 250E, 250Q, 428L, 428F, 250Q/428L (Hinton et al, 2004, *J. Biol. Chem.* 279(8): 6213-6216, Hinton et al. 2006 *Journal of Immunology* 176:346-356), 256A, 272A, 305A, 307A, 311A, 312A, 378Q, 380A, 382A, 434A (Shields et al., *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(9):6591-6604), 252F, 252Y, 252W, 254T, 256Q, 256E, 256D, 433R, 434F, 434Y, 252Y/254T/256E, 433K/434F/436H (Dall'Acqua et al. *Journal of Immunology*, 2002, 169:5171-5180, Dall'Acqua et al, 2006, *Journal of Biological Chemistry* 281:23514-23524). См. патент США № 8367805.

Модификация некоторых консервативных остатков в Fc IgG (I253, H310, Q311, H433, N434), такая как вариант N434A (Yeung et al. (2009) *J. Immunol.* 182:7663), была предложена как способ увеличения аффинности FcRn, тем самым увеличивая период полужизни антитела в циркулирующей крови. Публикация международной заявки WO 98/023289. Было показано, что комбинированный вариант Fc, содержащий M428L и N434S, увеличивает связывание FcRn и увеличивает период полужизни в сыворотке почти в пять раз. Zalevsky et al. (2010) *Nat. Biotechnol.* 28:157. Комбинированный вариант Fc, содержащий модификации T307A, E380A и N434A, также продлевает период полужизни антител IgG1. Petkova et al. (2006, *J. Int. Immunol.* 18:1759. Кроме того, было показано, что комбинированные варианты Fc, содержащие варианты M252Y-M428L, M428L-N434H, M428L-N434F, M428L-N434Y, M428L-N434A, M428L-N434M и M428L-N434S, продлевают период полужизни. Публикация международной заявки WO 2009/086320.

Кроме того, комбинированный вариант Fc, содержащий M252Y, S254T и T256E, увеличивает период полувыведения почти в 4 раза. Dall'Acqua et al. (2006) *J. Biol. Chem.* 281:23514. Связанная модификация IgG1, обеспечивающая повышенную аффинность FcRn, но сниженную зависимость от pH (M252Y-S254T-T256E-N433K-N434F), была использована для создания конструкции IgG1 ("MST-HN Abdeg") для использования в качестве конкурента для предотвращения связывания других антител с FcRn, приводя к увеличению клиренса этого другого антитела, либо эндогенного IgG (например, в аутоиммунной постановке), либо другого экзогенного (терапевтического) моноклонального антитела. Vaccaro et al. (2005) *Nat. Biotechnol.* 23:1283; публикация международной заявки WO 2006/130834.

Другие модификации для увеличения связывания FcRn описаны в Yeung et al. (2010) *J. Immunol.* 182:7663-7671; патентах № 6277375; 6821505; публикациях международных заявок WO 97/34631; WO 2002/060919.

Согласно некоторым вариантам осуществления гибридные изоформы IgG могут быть использованы для увеличения связывания FcRn и потенциального увеличения периода полужизни. Например, гибридный вариант IgG1/IgG3 может быть сконструирован путем замещения положений IgG1 в области CH2 и/или CH3 аминокислотами из IgG3 в положениях, где два изоформы различаются. Таким образом, может быть сконструировано гибридное вариантное антитело IgG, которое содержит одну или несколько замен, например, 274Q, 276K, 300F, 339T, 356E, 358M, 384S, 392N, 397M, 422I, 435R и 436F. Согласно другим описанным в настоящем документе вариантам осуществления гибридный вариант IgG1/IgG2 может быть сконструирован путем замены положений IgG2 в области CH2 и/или CH3 аминокислотами из IgG1 в положениях, в которых различаются два изоформы. Таким образом, может быть сконструировано гибридное вариантное антитело IgG, которое содержит одну или несколько замен, например, одну или несколько из следующих аминокислотных замен: 233E, 234L, 235L, -236G (относящихся к вставке глицина в положении 236) и 327A. См. патент США № 8629113. Был получен гибрид последовательностей IgG1/IgG2/IgG4, который предположительно увеличивает период полужизни в сыворотке крови и улучшает экспрессию. Патент США № 7867491 (порядковый номер 18 в настоящем документе).

Период полужизни в сыворотке крови антител по настоящему изобретению также может быть увеличен путем пегилирования. Антитело может быть пегилировано, например, для увеличения биологического (например, сывороточного) периода полужизни антитела. Для пегилирования антитела, антитела или его фрагмент, как правило, подвергают взаимодействию с реагентом полиэтиленгликолем (ПЭГ), таким как реакционноспособный сложный эфир или альдегидное производное ПЭГ, в условиях, когда одна или несколько групп ПЭГ присоединяются к антителу или фрагменту антитела. Предпочтительно,

пегилирование проводят посредством реакции ацилирования или реакции алкилирования с реакционно-способной молекулой ПЭГ (или аналогичным реакционноспособным водорастворимым полимером). Используемый в настоящем документе термин "полиэтиленгликоль" предназначен для охвата любой из форм ПЭГ, которые использовались для дериватизации других белков, таких как моно(C₁-C₁₀)алкокси-или арилоксиполиэтиленгликоль, или полиэтиленгликольмалеимид. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело, подлежащее пегилированию, представляет собой агликозилированное антитело. Способы для пегилирующих белков известны в настоящей области техники и могут быть применены к описанным в настоящем документе антителам. См., например, EP 0154316 от Nishimura et al. and EP 0401384 by Ishikawa et al.

Альтернативно, при некоторых обстоятельствах может быть желательным уменьшение периода полужизни антитела по настоящему изобретению, а не его увеличение. Модификации, такие как I253A (Hornick et al. (2000) *J. Nucl. Med.* 41:355) и H435A/R, I253A или H310A (Kim et al. (2000) *Eur. J. Immunol.* 29:2819) в Fc человеческого IgG1 могут уменьшать связывание FcRn, тем самым уменьшая период полужизни (увеличивая выведение) для использования в ситуациях, когда предпочтительным является быстрое выведение, например медицинская визуализация. См. также Kenanova et al. (2005) *Cancer Res.* 65:622. Другие средства для улучшения выведения предусматривают форматирование антигенсвязывающих доменов по настоящему изобретению в виде фрагментов антител, не обладающих способностью связывать FcRn, таких как фрагменты Fab. Такая модификация может уменьшить период полужизни антитела в кровеносном русле с пары недель до нескольких часов. Селективное пегилирование фрагментов антител затем можно использовать для тонкой настройки (увеличения) периода полувыведения фрагментов антитела, если это необходимо. Chapman et al. (1999) *Nat. Biotechnol.* 17:780. Фрагменты антител также могут быть слиты с человеческим сывороточным альбумином, например, в конструкции слитого белка, чтобы увеличить период полужизни. Yeh et al. (1992) *Proc. Nat'l Acad. Sci.* 89:1904. Альтернативно, биспецифическое антитело может быть сконструировано с первым антигенсвязывающим доменом по настоящему изобретению и вторым антигенсвязывающим доменом, который связывается с человеческим сывороточным альбумином (HSA). См. публикацию международной заявки на патент WO 2009/127691 и патентные ссылки, цитируемые в ней. Альтернативно, специализированные полипептидные последовательности могут быть добавлены к фрагментам антител для увеличения периода полужизни, например, полипептидные последовательности "XTEN". Schellenberger et al. (2009) *Nat. Biotechnol.* 27:1186; публикация международной заявки на патент WO 2010/091122.

Дополнительные варианты Fc.

При использовании константного домена IgG4, как правило, предпочтительно включать замещение S228P, которое имитирует шарнирную последовательность в IgG1 и тем самым стабилизирует молекулы IgG4, например, снижая обмен Fab-фрагментами между терапевтическим антителом и эндогенным IgG4 у подвергаемого лечению пациента. Labrijn et al. (2009) *Nat. Biotechnol.* 27:767; Reddy et al. (2000) *J. Immunol.*, 164:1925.

Потенциальный сайт расщепления протеазой в шарнире конструкций IgG1 можно удалить с помощью модификаций D221G и K222S, увеличивая стабильность антитела. Публикация международной заявки WO 2014/043344.

Аффинности и связывающие свойства варианта Fc для его лигандов (рецепторы Fc) могут быть определены с помощью различных способов анализа *in vitro* (биохимических или иммунологических анализов), известных в настоящей области техники, включая в себя, без ограничения, равновесные способы (например, ферментный иммуносорбентный анализ (ИФА) или радиоиммуноанализ (RIA)) или кинетику (например, анализ SPR BIACORE®) и другие способы, такие как анализы непрямого связывания, конкурентные ингибирующие анализы, резонансный перенос энергии флуоресценции (FRET), гель-электрофорез и хроматография (например, гель-фильтрация). Эти и другие способы могут использовать метку на одном или нескольких исследуемых компонентах и/или использовать множество способов обнаружения, включая в себя, без ограничения, хромогенные, флуоресцентные, люминесцентные или изотопные метки. Подробное описание аффинности и кинетики связывания можно найти в Paul W.E., ed, *Fundamental Immunology*, 4th Ed., Lippincott-Raven, Philadelphia (1999), где основное внимание уделяется взаимодействию антитело-иммуноген.

Согласно другим вариантам осуществления гликозилирование антитела модифицируют для увеличения или уменьшения эффекторной функции. Например, может быть получено агликозилированное антитело, которое не обладает всей эффекторной функцией, путем мутации сохраненного аспарагинового остатка в положении 297 (например, N297A), тем самым отменяя связывание комплемента и FcγRI. Bolt et al. (1993) *Eur. J. Immunol.*, 23:403. См. также Tao & Morrison (1989) *J. Immunol.* 143:2595 (с использованием N297Q в IgG1 для устранения гликозилирования в положении 297).

Хотя агликозилированные антитела, как правило, не характеризуются эффекторной функцией, могут быть введены мутации для восстановления этой функции. Агликозилированные антитела, например те, которые возникают в результате мутаций N297A/C/D/ или H или производятся в системах (например, *E. coli*), которые не представляют собой гликозилированные белки, могут быть дополнительно мутирова-

ны для восстановления связывания FcγR, например S298G и/или T299A/G/или H (публикация международной заявки WO 2009/079242) или E382V и M428I (Jung et al. (2010) Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA) 107:604).

Кроме того, антитело с улучшенной ADCC можно получить путем изменения гликозилирования. Например, было показано, что удаление фукозы из связанных с Asg297 тяжелой цепи олигосахаридов улучшает ADCC на основе улучшенного связывания с FcγRIIIa. Shields et al. (2002) JBC 277:26733; Niwa et al. (2005) J. Immunol. Methods 306: 151; Cardarelli et al. (2009) Clin. Cancer Res. 15:3376 (MDX-1401); Cardarelli et al. (2010) Cancer Immunol. Immunotherap. 59:257 (MDX-1342). Такие антитела с низким содержанием фукозы могут быть получены, например, в нокаутированных клетках яичника китайского хомячка (CHO), лишенных фукозилтрансферазы (FUT8) (Yamane-Ohnuki et al. (2004) Biotechnol. Bioeng. 87:614) или в других клетках, которые производят ацидолизованные антитела. См., например, Zhang et al. (2011) mAbs 3:289 и Li et al. (2006) Nat. Biotechnol. 24:210 (оба описывают производство антител в подвергнутом гликоинженерии *Pichia pastoris*.); Mossner et al. (2010) Blood 115:4393; Shields et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733; Shinkawa et al. (2003) J. Biol. Chem. 278:3466; Европейский патент EP 1176195 B1. ADCC также может быть улучшена, как описано в публикации PCT WO 03/035835, в которой раскрыто применение варианта клеточной линии CHO, Lec13, с уменьшенной способностью прикреплять фукозу к связанным с Asn (297) углеводам, что также приводит к гипофукозилированию антител, экспрессируемых в этой клетке-хозяине. См. также Shields R.L. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740. Альтернативно, аналоги фукозы могут быть добавлены в культуральную среду во время производства антител, чтобы ингибировать включение фукозы в углевод на антителе. Публикация международной заявки WO 2009/135181.

Увеличение структур с GlcNac в точках ветвления в связанных с антителами олигосахаридах также усиливает ADCC. Публикация PCT WO 99/54342 от Umana et al. описывает клеточные линии, сконструированные для экспрессии гликопротеин-модифицирующих гликозилтрансфераз (например, β(1,4)-N-ацетилглюкозаминилтрансфераза III (GnTIII)), так что антитела, экспрессируемые в сконструированных клеточных линиях, демонстрируют увеличенные структуры с GlcNac в точках ветвления, что приводит к увеличению активности ADCC антител (см. также Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17:176-180).

Были разработаны дополнительные варианты гликозилирования, которые лишены галактозы, сиаловой кислоты, остатков фукозы и ксилозы (так называемые гликоформы GNGN), которые демонстрируют улучшенные ADCC и ADCP, но уменьшенные CDC, а также другие, которые лишены сиаловой кислоты, фукозы и ксилозы (так называемые гликоформы G1/G2), которые демонстрируют улучшенные ADCC, ADCP и CDC. Публикация заявки на патент США № 2013/0149300. Антитела с этими паттернами гликозилирования необязательно производятся в генетически модифицированных растениях *N. benthamiana*, в которых были нокаутированы гены эндогенного ксилола и фукозилтрансферазы.

Гликоинжиниринг также может быть применен для модификации противовоспалительных свойств конструкции IgG путем изменения содержания сиалила α2,6 в углеводных цепях, присоединенных к Asn297 областей Fc, причем увеличенная доля сиалилированных форм α2,6 приводит к усиленным противовоспалительным эффектам. См. Nimmerjahn et al. (2008) Ann. Rev. Immunol. 26:513. Напротив, уменьшение доли антител, содержащих α2,6-сиалилированных углеводов, может быть полезным в случаях, когда противовоспалительные свойства не нужны. Способы модификации содержания сиалилирования α2,6 антител, например, путем селективной очистки α2,6-сиалилированных форм или путем ферментативной модификации, приведены в публикации заявки на патент США № 2008/0206246. Согласно другим вариантам осуществления аминокислотная последовательность Fc-области может быть модифицирована, чтобы имитировать эффект α2,6-сиалилирования, например, путем включения модификации F241A. Публикация международной заявки WO 2013/095966.

III. Физические свойства антител.

Описанные в настоящем документе антитела могут содержать один или несколько сайтов гликозилирования в вариательной области как легкой, так и тяжелой цепи. Такие сайты гликозилирования могут приводить к повышенной иммуногенности антитела или изменению pK антитела из-за измененного связывания антигена (Marshall et al. (1972) Ann. Rev. Biochem. 41:673-702; Gala and Morrison (2004) J. Immunol. 172:5489-94; Wallick et al. (1988) J. Exp. Med. 168:1099-109; Spiro (2002) Glycobiology 12:43R-56R; Parekh et al. (1985) Nature 316:452-7; Mimura et al. (2000) Mol. Immunol. 37:697-706). Известно, что гликозилирование происходит в мотивах, содержащих последовательность N-X-S/T. В некоторых случаях предпочтительно иметь антитело к TIGIT, которое не содержит гликозилирование вариательной области. Это может быть достигнуто либо путем выбора антител, которые не содержат мотив гликозилирования в вариательной области, либо путем мутирования остатков в области гликозилирования.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе антитела не содержат сайтов изомеризации аспарагина. Дезамидирование аспарагина может происходить на последовательностях N-G или D-G и приводить к образованию изоаспарагиновой кислоты, которая вводит перегиб в полипептидную цепь и снижает ее стабильность (эффект изоаспарагиновой кислоты).

Каждое антитело будет характеризоваться уникальной изоэлектрической точкой (pI), которая, как

правило, находится в диапазоне рН от 6 до 9,5. рI для антитела IgG1, как правило, находится в диапазоне рН 7-9,5, а рI для антитела IgG4, как правило, находится в диапазоне рН 6-8. Существует предположение, что антитела с рI вне нормального диапазона могут характеризоваться некоторым разворачиванием и нестабильностью в условиях *in vivo*. Таким образом, предпочтительно иметь антитело к TIGIT, которое характеризуется значением рI, которое находится в нормальном диапазоне. Это может быть достигнуто либо путем выбора антител с рI в нормальном диапазоне, либо путем мутирования заряженных поверхностных остатков.

Каждое антитело будет иметь характерную температуру плавления с более высокой температурой плавления, указывающей на большую общую стабильность *in vivo* (Krishnamurthy R. and Manning M.C. (2002) *Curr. Pharm. Biotechnol.* 3:361-71). Как правило, предпочтительно, чтобы T_{M1} (температура начального разворачивания) превышала 60°C, предпочтительно превышала 65°C, еще более предпочтительно превышала 70°C. Точку плавления антитела можно измерить, используя дифференциальную сканирующую калориметрию (Chen et al. (2003) *Pharm. Res.* 20:1952-60; Ghirlando et al. (1999) *Immunol. Lett.* 68:47-52) или круговой дихроизм (Murray et al. (2002) *J. Chromatogr. Sci.* 40:343-9).

Согласно предпочтительному варианту осуществления выбирают антитела, которые не быстро деградируют. Деградиация антитела может быть измерена с использованием капиллярного электрофореза (CE) и MALDI-MS (Alexander A.J. and Hughes D.E. (1995) *Anal. Chem.* 67:3626-32).

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления выбирают антитела, которые обладают минимальными эффектами агрегации, что может привести к возникновению нежелательного иммунного ответа и/или измененным или неблагоприятным фармакокинетическим свойствам. Как правило, антитела приемлемы с агрегацией 25% или менее, предпочтительно 20% или менее, еще более предпочтительно 15% или менее, еще более предпочтительно 10% или менее и даже более предпочтительно 5% или менее. Агрегацию можно измерить несколькими способами, включая в себя гель-фильтрационную колоночную (SEC), высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) и рассеяние света.

IV. Молекулы нуклеиновых кислот.

Другой аспект, описанный в настоящем документе, относится к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют описанные в документе антитела. Нуклеиновые кислоты могут присутствовать в целых клетках, в клеточном лизате или в частично очищенной или по существу чистой форме. Нуклеиновая кислота представляет собой "выделенную" или "приведенную в состояние практически чистой" при очищении от других клеточных компонентов или других загрязнителей, например, других клеточных нуклеиновых кислот (например, другой хромосомной ДНК, например, хромосомной ДНК, которая связана с выделенной ДНК в природе) или белков стандартными способами, предусматривающими обработку щелочами/ДСН, промывание CsCl, колоночную хроматографию, рестрикционные ферменты, электрофорез в агарозном геле и другие, хорошо известные в настоящей области техники. См. F. Ausubel et al., ed. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York. Описанная в настоящем документе нуклеиновая кислота может представлять собой, например, ДНК или РНК и может содержать или не содержать интронные последовательности. Согласно некоторым вариантам осуществления нуклеиновая кислота представляет собой молекулу кДНК.

Описанные в настоящем документе нуклеиновые кислоты могут быть получены с использованием стандартных способов молекулярной биологии. Для антител, экспрессируемых гибридомами (например, гибридомами, полученными от трансгенных мышей, несущих гены человеческого иммуноглобулина, как дополнительно описано ниже), кДНК, кодирующие легкие и тяжелые цепи антитела, полученные посредством гибридомы, могут быть получены с помощью стандартных техник амплификации ПЦР или клонирования кДНК. Для антител, полученных из библиотеки генов иммуноглобулина (например, с использованием способов фагового дисплея), нуклеиновая кислота, кодирующая антитело, может быть выделена из библиотеки.

После получения фрагментов ДНК, кодирующих сегменты VH и VL, эти фрагменты ДНК могут быть дополнительно обработаны стандартными способами рекомбинантной ДНК, например, для преобразования генов варибельной области в гены полноразмерной цепи антитела, гены Fab-фрагмента или ген ScFv. В этих манипуляциях кодирующий VL или VH фрагмент ДНК функционально связан с другим фрагментом ДНК, кодирующим другой белок, такой как константная область или гибкий линкер антитела. Используемый в этом контексте термин "функционально связанный" предназначен для обозначения того, что два фрагмента ДНК соединены таким образом, что аминокислотные последовательности, кодируемые двумя фрагментами ДНК, остаются в рамке.

Выделенная ДНК, кодирующая область VH, может быть превращена в ген полноразмерной тяжелой цепи путем функционального связывания кодирующей VH ДНК с другой молекулой ДНК, кодирующей константные области тяжелой цепи (шарнир, CH1, CH2 и/или CH3). Последовательности генов константной области тяжелой цепи человека известны в настоящей области техники (см., например, Kabat E.A. et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242), и фрагменты ДНК, охватывающие эти области, могут быть получены путем стандартной ПЦР-амплификации. Константная область тяжелой цепи может представ-

лять собой константную область IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM или IgD, например область IgG1. Для гена тяжелой цепи Fab-фрагмента кодирующая VH ДНК может быть функционально связана с другой молекулой ДНК, кодирующей только константную область CH1 тяжелой цепи.

Выделенная ДНК, кодирующая область VL, может быть превращена в ген полноразмерной легкой цепи (а также ген легкой цепи Fab) путем функционального связывания кодирующей VL ДНК с другой молекулой ДНК, кодирующей константную область легкой цепи, CL. Последовательности генов константной области легкой цепи человека известны в настоящей области техники (см., например, Kabat E.A. et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication № 91-3242), и фрагменты ДНК, охватывающие эти области, могут быть получены путем стандартной ПЦР-амплификации. Константная область легкой цепи может представлять собой константную область к или λ.

Чтобы создать ген scFv, фрагменты ДНК, кодирующие VH- и VL, функционально связывают с другим фрагментом, кодирующим гибкий линкер, например, кодирующим аминокислотную последовательность (Gly₄-Ser)₃, так что последовательности VH и VL могут быть экспрессированы в виде непрерывного одноцепочечного белка, причем области VL и VH соединяются гибким линкером (см., например, Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426; Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty et al. (1990) *Nature* 348:552-554).

V. Получение антител.

Различные антитела по настоящему изобретению, например те, которые конкурируют или связываются с тем же эпитопом, что и описанные в настоящем документе антитела к человеческому TIGIT, могут быть получены с использованием множества известных способов, таких как стандартный способ гибридизации соматических клеток, описанный Kohler and Milstein, *Nature* 256: 495 (1975). Хотя предпочтительны процедуры гибридизации соматических клеток, в принципе также могут быть использованы другие способы получения моноклональных антител, например вирусная или онкогенная трансформация В-лимфоцитов, техника фагового дисплея с использованием библиотек генов человеческих антител.

Предпочтительной животной системой для получения гибридом является мышечная система. Производство гибридомы у мышей представляет собой общепринятую процедуру. Протоколы иммунизации и способы выделения иммунизированных спленоцитов для слияния известны в настоящей области техники. Также известны партнеры по слиянию (например, мышинные клетки миеломы) и способы слияния.

Описанные в настоящем документе химерные или гуманизированные антитела могут быть получены на основе последовательности мышинного моноклонального антитела, полученного, как описано выше. ДНК, кодирующая тяжелую и легкую цепи иммуноглобулинов, может быть получена из представляющей интерес мышинной гибридомы и сконструирована так, чтобы содержать немышинные (например, человеческие) последовательности иммуноглобулина, используя стандартные способы молекулярной биологии. Например, для создания химерного антитела мышинные варибельные области могут быть связаны с константными областями человека с использованием способов, известных в настоящей области техники (см., например, патент США № 4816567 на имя Cabilly et al.). Для создания гуманизированного антитела мышинные CDR-области могут быть вставлены в каркас человека с использованием способов, известных в настоящей области техники (см., например, патент США № 5225539 на имя Winter и патенты США № 5530101, 5585089, 5697662 и 6280370 на имя Queen et al.).

Согласно одному варианту осуществления описанные в настоящем документе антитела представляют собой человеческие моноклональные антитела. Такие человеческие моноклональные антитела, направленные против TIGIT, могут быть получены с использованием трансгенных или трансхромосомных мышей, несущих части иммунной системы человека, а не системы мыши. Эти трансгенные и трансхромосомные мыши включают в себя мышей, называемых в настоящем документе мышами HuMAb и мышами KM, соответственно, и в совокупности упоминаются в настоящем документе как "мышь человеческих Ig".

Мышь HuMAb® (Medarex, Inc.) содержит минилокусы гена человеческого иммуноглобулина, которые кодируют нереаранжированные последовательности тяжелых ((μ и γ) и легкой κ цепи иммуноглобулинов, а также нацеленные мутации, которые инактивируют эндогенные локусы μ и κ-цепей (см., например, Lonberg et al. (1994) *Nature* 368(6474): 856-859). Соответственно, мышь демонстрирует пониженную экспрессию мышинного IgM или κ, а в ответ на иммунизацию введенные трансгены тяжелой и легкой цепи человека подвергаются переключению классов и соматической мутации для производства моноклонального человеческого IgGκ с высокой аффинностью (Lonberg N. et al. (1994), выше; рассмотренный в Lonberg N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg N. and Huszar D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 и Harding F. and Lonberg N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546). Получение и применение мышей HuMAb и геномных модификаций, переносимых такими мышами, далее описано в Taylor L. et al. (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen J. et al. (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuaille et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720-3724; Choi et al. (1993) *Nature Genetics* 4:117-123; Chen J. et al. (1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuaille et al. (1994) *J. Immunol.* 152:2912-

2920; Taylor L. et al. (1994) *International Immunology* 6: 579-591 и Fishwild D. et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851, содержание которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки. См. дополнительно патенты США № 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; 5789650; 5877397; 5661016; 5814318; 5874299 и 5770429; все на имя Lonberg and Kay; патент США № 5545807 на имя Surani et al; публикации PCT № WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 и WO 99/45962, все на имя Lonberg и Kay, и публикацию PCT № WO 01/14424 на имя Korman et al.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе антитела получают с использованием мыши, которая несет последовательности человеческого иммуноглобулина на трансгенах и трансхромосомах, такой как мышь, которая несет трансген тяжелой цепи человека и трансхромосому легкой цепи человека. Такие мыши, называемые в настоящем документе "мышьями КМ", подробно описаны в публикации PCT WO 02/43478 на имя Ishida et al.

Кроме того, альтернативные трансгенные системы животных, экспрессирующие гены человеческого иммуноглобулина, доступны в настоящей области техники и могут быть использованы для получения описанных в настоящем документе антител к TIGIT. Например, можно использовать альтернативную трансгенную систему, называемую Xenomouse (Abgenix, Inc.); такие мыши описаны, например, в патентах США № 5939598; 6075181; 6114598; 6150584 и 6169663 на имя Kucherlapati et al.

Более того, альтернативные трансхромосомные системы животных, экспрессирующие гены человеческого иммуноглобулина, доступны в настоящей области техники и могут быть использованы для получения описанных в настоящем документе антител к TIGIT. Например, могут быть использованы мыши, несущие как трансхромосому тяжелой цепи человека, так и трансхромосому легкой цепи человека, называемые "мышьями ТС"; такие мыши описаны в Tomizuka et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727. Кроме того, в настоящей области техники были описаны коровы, несущие трансхромосомы тяжелой и легкой цепи человека (Kuroiwa et al. (2002) *Nature Biotechnology* 20:889-894), и они могут быть использованы для получения описанных в настоящем документе антител к TIGIT.

Дополнительные описанные в настоящей области техники мышьяные системы для получения человеческих антител, например антител к TIGIT человека, включают в себя (i) мышь VELOCIMMUNE® (Regeneron Pharmaceuticals, Inc.), у которой варибельные области эндогенной мышьяной тяжелой и легкой цепи были заменены посредством гомологичной рекомбинации варибельными областями тяжелой и легкой цепи человека, функционально связанными с эндогенными константными областями мышья, так что химерные антитела (человеческая V/мышьяная C) появляются у мышья и затем превращаются в полностью человеческие антитела с использованием стандартных способов рекомбинантной ДНК; и (ii) мышь MeMo® (Merus Biopharmaceuticals, Inc.), причем мышь содержит нерearанжированные варибельные области тяжелой цепи человека, но одну rearанжированную общую область легкой цепи человека. Такие мыши и их применение для получения антител описаны, например, в публикации международной заявки WO 2009/15777, US 2010/0069614, WO 2011/072204, WO 2011/097603, WO 2011/163311, WO 2011/163314, WO 2012/148873, US 2012/0070861 и US 2012/0073004.

Описанные в настоящем документе моноклональные антитела человека также могут быть получены с использованием способов фагового дисплея для скрининга библиотек генов иммуноглобулина человека. Такие способы фагового дисплея для выделения человеческих антител установлены в настоящей области техники. См., например: патенты США № 5223409; 5403484 и 5571698 на имя Ladner et al; патенты США № 5427908 и 5580717 на имя Dower et al.; патенты США № 5969108 и 6172197 на имя McCafferty et al. и патенты США № 5885793; 6521404; 6544731; 6555313; 6582915 и 6593081 на имя Griffiths et al.

Описанные в настоящем документе моноклональные антитела человека также могут быть получены с использованием мышья SCID, в которых человеческие иммунные клетки были воссозданы таким образом, что при иммунизации может быть получен ответ на антитела человека. Такие мыши описаны, например, в патентах США № 5476996 и 5698767, на имя Wilson et al.

Иммунизация.

Чтобы получить полностью человеческие антитела к человеческому TIGIT, трансгенные или трансхромосомные мыши, содержащие гены человеческого иммуноглобулина (например, HCo12, HCo7 или КМ мышья), могут быть иммунизированы очищенным или обогащенным препаратом антигена TIGIT и/или клеток, экспрессирующих TIGIT, как описано для других антигенов, например Lonberg et al. (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Fishwild et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851 и в публикации международной заявки WO 98/24884. Альтернативно, мыши могут быть иммунизированы ДНК, кодирующей человеческий TIGIT. Предпочтительно, мыши будут в возрасте 6-16 недель после первой инфузии. Например, очищенный или обогащенный препарат (5-50 мкг) рекомбинантного антигена TIGIT может быть использован для внутрибрюшинной иммунизации мышья HuMAb. В том случае, если иммунизация с использованием очищенного или обогащенного препарата антигена TIGIT не приводит к антителам, мышья также можно иммунизировать клетками, экспрессирующими TIGIT, например клеточной линией, для стимулирования иммунных реакций. Иллюстративные клеточные линии включают в себя сверхэкспрессирующие TIGIT стабильные клеточные линии CHO и Raji.

Накопленный опыт с различными антигенами показал, что трансгенные мыши HuMAb лучше всего

реагируют, когда первоначально иммунизировали внутрибрюшинно (IP) или подкожно (SC) антигеном в адьюванте Ribi, а затем каждую неделю иммунизировали IP/SC (до общего количества 10) антигеном в адьюванте Ribi. Иммунный ответ можно контролировать во время протокола иммунизации, при этом образцы плазмы получают посредством ретроорбитальных кровоточений. Плазму можно подвергать скринингу с помощью ИФА и FACS (как описано ниже), а для слияний могут использоваться мыши с достаточным количеством титров человеческого иммуноглобулина к TIGIT. Мышей можно стимулировать внутривенно антигеном за 3 дня до умерщвления и удаления селезенки и лимфатических узлов. Ожидается, что, возможно, потребуется выполнить 2-3 слияния для каждой иммунизации. От 6 до 24 мышей, как правило, иммунизируют для каждого антигена. Как правило, используются штаммы HCo7, HCo12 и KM. Кроме того, как трансген HCo7, так и HCo12 можно воссоздать совместно в одной мыши, содержащей два разных трансгена тяжелой цепи человека (HCo7/HCo12).

Производство гибридом, производящих моноклональные антитела к TIGIT.

Для получения гибридом, производящих описанные в настоящем документе моноклональные антитела, спленоциты и/или клетки лимфатических узлов от иммунизированных мышей могут быть выделены и слиты с соответствующей иммортализованной клеточной линией, такой как клеточная линия мышинной миеломы. Полученные гибридомы можно подвергать скринингу для получения антигенспецифических антител. Например, одноцепочечные суспензии селезеночных лимфоцитов от иммунизированных мышей могут быть слиты с несекретирующими клетками миеломы Sp2/0 мыши (ATCC, CRL 1581) с 50% ПЭГ. Клетки высевают в дозе приблизительно 2×10^5 в планшеты для микротитрования с плоским дном с последующей двухнедельной инкубацией в селективной среде, содержащей 10% фетальную клонсерывотку, 18% кондиционированную среду "653", 5% ориген (IGEN), 4 мМ L-глутамин, 1 мМ пируват натрия, 5 мМ HEPES, 0,055 мМ 2-меркаптоэтанол, 50 ед./мл пенициллина, 50 мг/мл стрептомицина, 50 мг/мл гентамицина и 1-кратный НАТ (Sigma). Через приблизительно две недели клетки можно культивировать в среде, в которой НАТ заменяют на НТ. Затем отдельные лунки можно подвергать скринингу с помощью ИФА для человеческих моноклональных антител IgM и IgG. После экстенсивного роста гибридомы среду можно наблюдать, как правило, через 10-14 дней. Секретирующие антитела гибридомы могут быть реплицированы, снова подвергнуты скринингу и, если они еще положительны для человеческого IgG, моноклональные антитела могут быть субклонированы по меньшей мере дважды посредством ограничивающего разведения. Стабильные субклоны можно затем культивировать *in vitro* для получения небольших количеств антител в тканевой культуральной среде для характеристики.

Для очистки моноклональных антител отдельные гибридомы можно выращивать в двухлитровых вращающихся колбах для очистки моноклональных антител. Супернатанты можно фильтровать и концентрировать перед аффинной хроматографией с белком А-сефароза (Pharmacia, Piscataway, N.J.). Элюированный IgG можно проверить с помощью гель-электрофореза и высокоэффективной жидкостной хроматографии для обеспечения чистоты. Буферный раствор можно заменить на PBS, и концентрацию можно определить с помощью OD₂₈₀ с использованием коэффициента экстинкции 1,43. Моноклональные антитела можно разделить на аликвоты и хранить при -80°C.

VI. Производство антител.

Получение трансфектом, производящих моноклональные антитела к TIGIT.

Антитела по настоящему изобретению, включая в себя как специфические антитела, для которых предусмотрены последовательности, так и другие родственные антитела к TIGIT, могут быть получены в трансфектоне клетки-хозяина, используя, например, комбинацию способов рекомбинантной ДНК и способов трансфекции генов, как хорошо известно в настоящей области техники (Morrison S. (1985) Science 229:1202).

Например, для экспрессии антител или их фрагментов ДНК, кодирующие легкие и тяжелые цепи с частичной или полной длиной, могут быть получены стандартными способами молекулярной биологии (например, ПЦР-амплификацией или клонированием кДНК с использованием гибридомы, которая экспрессирует антитело), и ДНК могут быть вставлены в векторы экспрессии, так что гены функционально связываются с транскрипционными и трансляционными контрольными последовательностями. В этом контексте термин "функционально связанный" означает, что ген антитела лигируют в вектор, так что транскрипционные и трансляционные контрольные последовательности внутри вектора служат для их предполагаемой функции регулирования транскрипции и трансляции гена антитела. Экспрессирующие векторы и последовательности контроля экспрессии выбирают таким образом, чтобы они были совместимы с используемой клеткой-хозяином экспрессией. Ген легкой цепи антитела и ген тяжелой цепи антитела можно встраивать в отдельный вектор или оба гена встраивают в один и тот же вектор экспрессии. Гены антитела встраивают в экспрессирующий(е) вектор(ы) стандартными способами (например, лигированием комплементарных сайтов рестрикции на фрагменте и векторе гена антитела или лигированием тупых концов, если нет сайтов рестрикции). Варибельные области легкой и тяжелой цепи описанных в настоящем документе антител могут быть использованы для создания генов полноразмерного антитела любого изотипа антитела путем вставки их в векторы экспрессии, уже кодирующие константные области тяжелой цепи и легкой цепи желаемого изотипа, так что сегмент V_H функционально связан с

сегмент(ами) C_H внутри вектора, а сегмент V_L функционально связан с сегментом C_L внутри вектора. Дополнительно или альтернативно, рекомбинантный экспрессирующий вектор может кодировать сигнальный пептид, который облегчает секрецию цепи антитела из клетки-хозяина. Ген цепи антитела может быть клонирован в вектор, так что сигнальный пептид связан в рамке с аминоконцом гена цепи антитела. Сигнальный пептид может представлять собой сигнальный пептид иммуноглобулина или гетерологичный сигнальный пептид (т.е. сигнальный пептид из белка неиммуноглобулина).

В дополнение к генам цепи антитела рекомбинантные экспрессирующие векторы могут нести регуляторные последовательности, которые контролируют экспрессию генов цепи антитела в клетке-хозяине. Термин "регуляторная последовательность" предназначен для включения промоторов, энхансеров и других элементов контроля экспрессии (например, сигналов полиаденилирования), которые контролируют транскрипцию или трансляцию генов цепи антитела. Такие регуляторные последовательности описаны, например, в Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Специалистам в настоящей области техники будет понятно, что дизайн вектора экспрессии, включая в себя выбор регуляторных последовательностей, может зависеть от таких факторов, как выбор трансформирующей клетки-хозяина, уровень экспрессии желаемого белка и т.д. Предпочтительные регуляторные последовательности для экспрессии клеток-хозяев млекопитающих включают в себя вирусные элементы, которые направляют высокие уровни экспрессии белка в клетках млекопитающих, такие как промоторы и/или энхансеры, полученные из цитомегаловируса (CMV), вируса обезьяны 40 (SV40), аденовируса (например, аденовирусный основной поздний промотор (AdMLP) и полиомы. Альтернативно, могут быть использованы невирусные регуляторные последовательности, такие как убиквитиновый промотор или β -глобиновый промотор. Кроме того, регуляторные элементы состоят из последовательностей из разных источников, таких как промоторная система SRA, которая содержит последовательности из раннего промотора SV40 и длинного концевой повтора вируса лейкоза Т-клеток человека типа 1 (Takebe Y. et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8:466-472).

В дополнение к генам цепи антитела и регуляторным последовательностям рекомбинантные экспрессирующие векторы могут нести дополнительные последовательности, такие как последовательности, которые регулируют репликацию вектора в клетках-хозяевах (например, точки начала репликации) и селективные маркерные гены. Селективный маркерный ген облегчает выбор клеток-хозяев, в которые был введен вектор (см., например, патенты США № 4399216, 4634665 и 5179017, все на имя Axel et al.). Например, как правило, селективный маркерный ген обеспечивает устойчивость к лекарственным средствам, таким как G418, гигромицин или метотрексат, в клетке-хозяине, в которую был введен вектор. Предпочтительные селективные маркерные гены включают в себя ген дигидрофолатредуктазы (DHFR) (для применения в клетках-хозяевах dhfr с селекцией/амплификацией метотрексата) и нео-ген (для выбора G418).

Для экспрессии легкой и тяжелой цепей вектор(ы) экспрессии, кодирующий(е) тяжелую и легкую цепи, трансфицируют в клетку-хозяина стандартными способами. Различные формы термина "трансфекция" предназначены для охвата широкого спектра способов, как правило, используемых для введения экзогенной ДНК в прокариотическую или эукариотическую клетку-хозяина, например электропорация, осаждение кальций-фосфатом, DEAE-декстран-трансфекция и тому подобное. Хотя теоретически возможно экспрессировать описанные в настоящем документе антитела в прокариотических или эукариотических клетках-хозяевах, экспрессия антител в эукариотических клетках и наиболее предпочтительно клетках-хозяевах млекопитающих является наиболее предпочтительной потому, что такие эукариотические клетки и, в частности, клетки млекопитающих, представляют собой более подобные, чем прокариотические клетки, для сборки и секреции правильно сложенного и иммунологически активного антитела. Сообщалось, что прокариотическая экспрессия генов антитела неэффективна для получения высоких выходов активного антитела (Boss M.A. and Wood C.R. (1985) Immunology Today 6:12-13). Антитела по настоящему изобретению также могут быть получены в гликоинжинированных штаммах дрожжей *Pichia pastoris*. Li et al. (2006) Nat. Biotechnol. 24:210.

Предпочтительные клетки-хозяева млекопитающих для экспрессии описанных в настоящем документе рекомбинантных антител включают в себя яичник китайского хомячка (клетки CHO) (включая в себя клетки dhfr-CHO, описанные в Urlaub and Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, используемые с селективным маркером DHFR, например, как описано в R.J. Kaufman and P.A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621), клетки миеломы NSO, клетки COS и клетки SP2. В частности, для использования с клетками миеломы NSO другой предпочтительной системой экспрессии является система экспрессии GS-гена, раскрытая в публикациях международной заявки WO 87/04462, WO 89/01036 и Европейском патенте EP 338841. Когда рекомбинантные экспрессирующие векторы, кодирующие гены антитела, вводят в клетки-хозяева млекопитающих, антитела получают путем культивирования клеток-хозяев в течение периода времени, достаточного для того, чтобы допустить экспрессию антитела в клетках-хозяевах или, более предпочтительно, секрецию антитела в культуральную среду, в которой выращивают клетки-хозяева. Антитела могут быть выделены из культуральной среды с использованием стандартных способов очистки белка.

N- и C-концы полипептидных цепей антител по настоящему изобретению могут отличаться от ожи-

даемой последовательности из-за обычно наблюдаемых посттрансляционных модификаций. Например, С-концевые остатки лизина часто отсутствуют в тяжелых цепях антител. Dick et al. (2008) *Biotechnol. Bioeng.* 100:1132. N-концевые остатки глутамин и в меньшей степени глутаматные остатки часто превращаются в остатки пироглутамата как на легких, так и на тяжелых цепях терапевтических антител. Dick et al. (2007) *Biotechnol. Bioeng.* 97:544; Liu et al. (2011) *JBC* 286:11211; Liu et al. (2011) *J. Biol. Chem.* 286:11211.

Аминокислотные последовательности для различных антител-агонистов к huTIGIT по настоящему изобретению представлены в перечне последовательностей, который представлен в табл. 5. По указанным выше причинам С-концевой лизин не включен ни в одну из последовательностей в перечне последовательностей для тяжелых цепей или константных доменов тяжелых цепей. Однако согласно альтернативному варианту осуществления каждая тяжелая цепь для антител к huTIGIT по настоящему изобретению и/или генетическая конструкция, кодирующая такие антитела или их тяжелые или легкие цепи, включает в себя этот дополнительный остаток лизина на С-конце тяжелой цепи(ей).

VII. Анализы.

Описанные в настоящем документе антитела могут быть исследованы на предмет связывания с TIGIT, например, стандартным ИФА. Вкратце, планшеты для микротитрования покрывают очищенным TIGIT в концентрации 1-2 мкг/мл в PBS и затем блокируют 5% бычьим сывороточным альбумином в PBS. В каждую лунку добавляют растворы антител (например, разведения плазмы у мышей, иммунизированных TIGIT) и инкубируют в течение 1-2 ч при 37°C. Планшеты промывают PBS/Tween и затем инкубируют со вторичным реагентом, например, для человеческих антител или антител, иным образом имеющих константную область тяжелой цепи человека, Fc-специфическим козым поликлональным реагентом к IgG человека, конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP) в течение 1 ч при 37°C. После промывания планшеты проявляют с подложкой ABTS (Moss Inc., продукт ABTS-1000) и анализируют с помощью спектрофотометра на OD 415-495. Сыворотки от иммунизированных мышей затем дополнительно подвергают скринингу с помощью проточной цитометрии на связывание с клеточной линией, экспрессирующей человеческий TIGIT, но не с контрольной клеточной линией, которая не экспрессирует TIGIT. Вкратце, связывание антител к TIGIT оценивают путем инкубации экспрессирующих TIGIT клеток CHO с антителом к TIGIT при разведении 1:20. Клетки промывают и связывание обнаруживают с помощью PE-меченого антитела к IgG человека. Проточные цитометрические анализы проводят с использованием проточной цитометрии FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA). Предпочтительно мышей, которые проявляют самые высокие титры, будут использовать для слияний. Аналогичные эксперименты могут быть выполнены с использованием антимышиных детектирующих антител, если должны быть обнаружены мышинные антитела к huTIGIT.

Описанный выше анализ ИФА можно использовать для скрининга на антитела и, таким образом, гибридомы, которые производят антитела, которые проявляют положительную реактивность с иммуногеном TIGIT. Гибридомы, которые производят антитела, которые связываются, предпочтительно с высоким сродством, с TIGIT, могут затем быть субклонированы и дополнительно охарактеризованы. Один клон от каждой гибридомы, который сохраняет реакционную способность исходных клеток (с помощью ИФА), затем может быть выбран для создания банка клеток и для очистки антител.

Для очистки антител к TIGIT выбранные гибридомы можно выращивать в двухлитровых вращающихся колбах для очистки моноклональных антител. Супернатанты можно фильтровать и концентрировать перед аффинной хроматографией с белком А-сефароза (Pharmacia, Piscataway, NJ). Элюированный IgG можно проверить с помощью гель-электрофореза и высокоэффективной жидкостной хроматографии для обеспечения чистоты. Буферный раствор можно заменить на PBS и концентрацию можно определить с помощью OD₂₈₀ с использованием коэффициента экстинкции 1,43. Моноклональные антитела можно разделить на аликвоты и хранить при -80°C.

Чтобы определить, связываются ли выбранные моноклональные антитела к TIGIT с уникальными эпитопами, каждое антитело может быть биотинилировано с использованием коммерчески доступных реагентов (Pierce, Rockford, IL). Связывание биотинилированного моноклонального антитела может быть обнаружено с помощью меченого стрептавидинового зонда. Конкурентные исследования с использованием немеченых моноклональных антител и биотинилированных моноклональных антител могут быть выполнены с использованием покрытых TIGIT планшетов ИФА, как описано выше.

Для определения изотипа очищенных антител могут быть выполнены изотипные ИФА с использованием реагентов, специфических для антител конкретного изотипа. Например, для определения изотипа человеческого моноклонального антитела лунки планшетов для микротитрования могут быть покрыты античеловеческим иммуноглобулином в концентрации 1 мкг/мл в течение ночи при 4°C. После блокирования 1% БСА планшеты подвергают взаимодействию с 1 мкг/мл или менее исследуемых моноклональных антител или очищенных изотипических контролей в течение одного-двух часов при температуре окружающей среды. Затем лунки могут быть подвергнуты взаимодействию либо с человеческими IgG1, либо со специфическими к IgM конъюгированными с щелочной фосфатазой зондами. Планшеты проявляют и анализируют, как описано выше.

Для исследования связывания моноклональных антител с живыми клетками, экспрессирующими TIGIT, можно использовать проточную цитометрию, как описано в примерах. Вкратце, клеточные линии, экспрессирующие мембраносвязанные TIGIT (выращенные в стандартных условиях роста), смешивают с различными концентрациями моноклональных антител в PBS, содержащем 0,1% BSA, при 4°C в течение 1 ч. После промывания клетки подвергают взаимодействию с меченым фикоэритрином (PE) антителом к IgG в тех же условиях, что и окрашивание первичных антител. Образцы могут быть проанализированы с помощью прибора FACScan с использованием свойств светового и бокового рассеяния для гейтирования отдельных клеток и определения связывания меченых антител. Может быть использован альтернативный анализ с использованием флуоресцентной микроскопии помимо (или вместо) способа проточной цитометрии. Клетки можно окрашивать точно так, как описано выше, и исследовать с помощью флуоресцентной микроскопии. Этот способ позволяет визуализировать отдельные клетки, но может характеризоваться сниженной чувствительностью в зависимости от плотности антигена.

Антитела к TIGIT могут быть дополнительно исследованы на реактивность с антигеном TIGIT с помощью Вестерн-блоттинга. Вкратце, клеточные экстракты из клеток, экспрессирующих TIGIT, могут быть получены и подвергнуты электрофорезу в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия. После электрофореза разделенные антигены будут переносить на нитроцеллюлозные мембраны, блокировать 20% мышинной сывороткой и исследовать моноклональные антитела, подлежащие анализу. Связывание IgG может быть обнаружено с использованием щелочной фосфатазы к IgG и проявлено с использованием таблеток субстрата BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO).

Способы анализа аффинности связывания, перекрестной реактивности и кинетики связывания различных антител к TIGIT предусматривают стандартные анализы, известные в настоящей области техники, например, анализ Biolayer Interferometry (BLI) и анализ поверхностного плазменного резонанса (SPR) BIACORE® с использованием прибора SPR BIACORE® 2000 (Biacore AB, Уппсала, Швеция).

Согласно одному варианту осуществления антитело специфически связывается с внеклеточной областью человеческого TIGIT. Антитело может специфически связываться с конкретным доменом (например, функциональным доменом) внутри внеклеточного домена TIGIT. Согласно конкретному варианту осуществления антитело специфически связывается с сайтом на TIGIT, с которым связывается PVR. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело специфически связывается с внеклеточной областью человеческого TIGIT и внеклеточной областью TIGIT яванского макака. Предпочтительно, антитело связывается с человеческим TIGIT с высокой аффинностью.

VIII. Биспецифические молекулы.

Описанные в настоящем документе антитела могут быть использованы для образования биспецифических молекул. Антитело к TIGIT или его антигенсвязывающие фрагменты могут быть дериватизированы или связаны с другой функциональной молекулой, например с другим пептидом или белком (например, другим антителом или лигандом для рецептора) с образованием биспецифической молекулы, которая связывается по меньшей мере с двумя разными сайтами связывания или молекулами-мишенями. Описанное в настоящем документе антитело может фактически быть дериватизировано или связано с более чем одной другой функциональной молекулой с образованием мультиспецифических молекул, которые связываются более чем с двумя различными сайтами связывания и/или молекулами-мишенями; такие мультиспецифические молекулы также должны охватываться используемым в настоящем документе термином "биспецифическая молекула". Для создания описанной в настоящем документе биспецифической молекулы описанное в настоящем документе антитело может быть функционально связано (например, посредством химической связи, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иначе) с одной или несколькими другими связывающими молекулами, такими как другое антитело, фрагмент антитела, пептид или связывающий миметик, так что получается биспецифическая молекула.

Соответственно, в настоящем документе предусмотрены биспецифические молекулы, содержащие по меньшей мере одну первую специфичность связывания для TIGIT и вторую специфичность связывания для второго эпитопа-мишени. Согласно описанному в настоящем документе варианту осуществления, в котором биспецифическая молекула представляет собой мультиспецифическую, молекула может дополнительно предусматривать третью связывающую специфичность.

Согласно одному варианту осуществления описанные в настоящем документе биспецифические молекулы содержат в качестве специфичности связывания по меньшей мере одно антитело или его фрагмент, включая в себя, например, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv или одноцепочечный Fv. Антитело также может представлять собой димер легкой цепи или тяжелой цепи или любой его минимальный фрагмент, такой как Fv или одноцепочечная конструкция, как описано в Ladner et al., патент США № 4946778, содержание которого явно включено посредством ссылки.

Хотя человеческие моноклональные антитела представляют собой предпочтительные, другие антитела, которые могут быть использованы в описанных в настоящем документе биспецифических молекулах, представляют собой мышинные, химерные и гуманизированные моноклональные антитела.

Описанные в настоящем документе биспецифические молекулы могут быть получены путем конъюгации составляющих связывающих специфических свойств с использованием способов, известных в

настоящей области техники. Например, каждая специфичность связывания биспецифической молекулы может быть получена отдельно и затем конъюгирована друг с другом. Когда специфичность связывания представляет собой белки или пептиды, для ковалентного конъюгации можно использовать различные связывающие или сшивающие средства. Примеры сшивающих средств включают в себя белок А, карбодимид, N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетат (SATA), 5,5'-дитиобис(2-нитробензойную кислоту) (DTNB), о-фенилендималеимид (oPDM), N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP) и сульфосукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклохаксан-1-карбоксилат (сульфо-SMCC) (см., например, Karpovsky et al. (1984) *J. Exp. Med.* 160:1686; Liu M.A. et al. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8648). Другие способы предусматривают те, которые описаны в Paulus (1985) *Behring Ins. Mitt.* No. 78, 118-132; Brennan et al. (1985) *Science* 229:81-83 и Glennie et al. (1987) *J. Immunol.* 139: 2367-2375). Предпочтительные конъюгирующие средства представляют собой SATA и сульфо-SMCC, оба доступны от Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Когда специфичности связывания представляют собой антитела, они могут быть конъюгированы посредством сульфгидрильной связки с шарнирной областью С-конца двух тяжелых цепей. Согласно особенно предпочтительному варианту осуществления шарнирная область модифицирована так, чтобы содержать нечетное количество сульфгидрильных остатков, предпочтительно один, до конъюгации.

Альтернативно, обе специфичности связывания могут быть закодированы в одном и том же векторе и экспрессированы и собраны в одной и той же клетке-хозяине. Этот способ особенно применим, когда биспецифическая молекула представляет собой слитый белок моноклонального антитела с моноклональным антителом, моноклонального антитела с Fab, Fab с F(ab')₂ или лиганда с Fab. Описанная в настоящем документе биспецифическая молекула может представлять собой одноцепочечную молекулу, содержащую одно одноцепочечное антитело и детерминант связывания, или одноцепочечную биспецифическую молекулу, содержащую два связывающих детерминанта. Биспецифические молекулы могут содержать по меньшей мере две одноцепочечные молекулы. Способы получения биспецифических молекул описаны, например, в патенте США № 5260203; патенте США № 5455030; патенте США № 4881175; патенте США № 5132405; патенте США № 5091513; патенте США № 5476786; патенте США № 5013653; патенте США 5258498 и патенте США № 5482858.

Связывание биспецифических молекул с их специфическими мишенями может быть подтверждено с использованием известных в настоящей области техники способов, таких как фермент-связанный иммуносорбентный анализ (ИФА), радиоиммуноанализ (RIA), анализ FACS, биоанализ (например, ингибирование роста) или Вестерн-блоттинг. Каждый из этих анализов, как правило, обнаруживает присутствие представляющих особый интерес комплексов протеин-антитело с использованием меченого реагента (например, антитела), специфического для представляющего интерес комплекса.

IX. Композиции.

Дополнительно предусмотрены композиции, например фармацевтические композиции, содержащие описанные в настоящем документе антитела к TIGIT или их антигенсвязывающий фрагмент(ы) вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Такие композиции могут включать в себя одно или комбинацию (например, два или более разных) антител или иммуноконъюгатов или биспецифических молекул, описанных в настоящем документе. Например, описанная в настоящем документе фармацевтическая композиция может содержать комбинацию антител (или иммуноконъюгатов или биспецифических антител), которые связываются с различными эпитопами на антигене-мишени или характеризуются комбинаторными активностями.

Согласно некоторым вариантам осуществления композиция содержит антитело к TIGIT в концентрации по меньшей мере 1, 5, 10, 50, 100, 150, 200 мг/мл или в концентрации 1-300 или 100-300 мг/мл.

Описанные в настоящем документе фармацевтические композиции также могут вводиться в комбинированной терапии, т.е. в сочетании с другими средствами. Например, комбинированная терапия может включать в себя описанное в настоящем документе антитело к TIGIT в сочетании по меньшей мере с одним другим противоопухолевым и/или стимулирующим Т-клетки (т.е. активирующим) средством. Примеры терапевтических средств, которые можно использовать в комбинированной терапии, более подробно описаны ниже в разделе о применении описанных в настоящем документе антител.

Согласно некоторым вариантам осуществления раскрытые в настоящем документе терапевтические композиции могут включать в себя другие соединения, лекарственные средства и/или средства, применяемые для лечения злокачественной опухоли. Такие соединения, лекарственные средства и/или средства могут включать в себя, например, химиотерапевтические лекарственные средства, малые молекулы или антитела, которые стимулируют иммунный ответ на данную злокачественную опухоль. В некоторых случаях терапевтические композиции могут включать в себя, например, одно или несколько антител к CTLA-4, антитело к PD-1, антитело к PD-L1, антитело к CD40, антитело к OX40 (также известное как CD134, TNFRSF4, ACT35 и/или TXGP1L), антитело к LAG-3, антитело к CD73, антитело к CD137, антитело к CD27, антитело к CSF-1R, агонист TLR или низкомолекулярный антагонист IDO или TGFβ.

Используемый в настоящем документе термин "фармацевтически приемлемый носитель" включает в себя любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические и абсорбирующие задерживающие средства и тому подобное, которые

являются физиологически совместимыми. Предпочтительно носитель подходит для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального введения (например, путем инъекции или инфузии). В зависимости от способа введения активное соединение, т.е. антители, иммуноконъюгат или биспецифическая молекула, может быть покрыто материалом для защиты соединения от действия кислот и других природных условий, которые могут инактивировать соединение.

Описанные в настоящем документе фармацевтические соединения могут включать в себя одну или несколько фармацевтически приемлемых солей.

"Фармацевтически приемлемая соль" относится к соли, которая сохраняет желаемую биологическую активность исходного соединения и не оказывает нежелательного токсического действия (см., например, Berge S.M. et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19). Примеры таких солей включают в себя кислотно-аддитивные соли и основные аддитивные соли. Кислотно-аддитивные соли включают в себя соли, полученные из нетоксичных неорганических кислот, таких как хлористоводородная, азотная, фосфорная, серная, бромистоводородная, иодистоводородная, фосфорная и т.п., а также из нетоксичных органических кислот, таких как алифатические моно- и дикарбоновые кислоты, фенилзамещенные алкановые кислоты, гидроксикарбоновые кислоты, ароматические кислоты, алифатические и ароматические сульфокислоты и тому подобное. Основные аддитивные соли включают в себя соли, полученные из щелочноземельных металлов, таких как натрий, калий, магний, кальций и т.п., а также из нетоксичных органических аминов, таких как N,N'-дибензилэтилендиамин, N-метилглюкамин, хлорпрокаин, холин, диэтаноламин, этилендиамин, прокаин и тому подобное.

Описанная в настоящем документе фармацевтическая композиция также может включать в себя фармацевтически приемлемый антиоксидант. Примеры фармацевтически приемлемых антиоксидантов включают в себя: (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и тому подобное; (2) жирорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), лецитин, пропилгаллат, α -токоферол и тому подобное; и (3) металлохелатирующие средства, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и тому подобное.

Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые могут быть использованы в описанных в настоящем документе фармацевтических композициях, включают в себя воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и подходящие их смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъецируемые органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Правильную текучесть можно поддерживать, например, путем использования материалов для покрытия, таких как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и путем использования поверхностно-активных веществ.

Эти композиции могут также содержать адьюванты, такие как консерванты, смачивающие средства, эмульгаторы и диспергирующие средства. Предотвращение присутствия микроорганизмов может быть обеспечено как процедурами стерилизации, выше, так и включением различных антибактериальных и противогрибковых средств, например парабена, хлорбутанола, фенол-сорбиновой кислоты и тому подобного. Также может быть желательным включать в композиции изотонические средства, такие как сахара, хлорид натрия и тому подобное. Кроме того, длительная абсорбция инъекционной фармацевтической формы может быть вызвана включением средств, которые замедляют всасывание, таких как моностеарат алюминия и желатин.

Фармацевтически приемлемые носители включают в себя стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных растворов для инъекций или дисперсии. Использование таких сред и средств для фармацевтически активных веществ известно в настоящей области техники. За исключением того, что любая обычная среда или средство несовместимы с активным соединением, предполагается их использование в описанных в настоящем документе фармацевтических композициях. В композиции также могут быть включены дополнительные активные соединения.

Терапевтические композиции, как правило, должны быть стерильными и стабильными в условиях производства и хранения. Композицию можно приготовить в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации лекарственного средства. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и подходящие их смеси. Правильную текучесть можно поддерживать, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и с использованием поверхностно-активных веществ. Во многих случаях предпочтительно включать изотонические средства, например сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит, или хлорид натрия в композицию. Длительная абсорбция инъецируемых композиций может быть достигнута путем включения в состав средства, которое задерживает абсорбцию, например моностеаратные соли и желатин.

Стерильные растворы для инъекций могут быть получены путем включения активного соединения в требуемом количестве в подходящем растворителе с использованием одного ингредиента или комби-

нации перечисленных выше ингредиентов с последующей стерилизационной микрофильтрацией. Как правило, дисперсии получают путем включения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и требуемые другие ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций предпочтительные способы получения представляют собой вакуумную сушку и замораживание-высушивание (лиофилизацию), которые дают порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из ранее стерильно-фильтрованного раствора.

Количество активного ингредиента, которое можно комбинировать с материалом-носителем для получения разовой лекарственной формы, будет варьировать в зависимости от подвергаемого лечению субъекта и конкретного способа введения. Количество активного ингредиента, которое можно комбинировать с материалом-носителем для получения разовой лекарственной формы, как правило, будет представлять собой такое количество композиции, которое дает терапевтический эффект. Как правило, из 100% это количество будет составлять от приблизительно 0,01% до приблизительно 99% активного ингредиента, предпочтительно от приблизительно 0,1% до приблизительно 70%, наиболее предпочтительно от приблизительно 1% до приблизительно 30% активного ингредиента в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем.

Схемы дозирования корректируют для обеспечения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического ответа). Например, можно вводить один болюс, можно вводить несколько разделенных доз с течением времени, или доза может быть пропорционально уменьшена или увеличена в соответствии с требованиями терапевтической ситуации. Особенно выгодно составлять парентеральные композиции в форме дозированной единицы для удобства введения и единообразия дозировки. Используемая в настоящем документе форма дозированной единицы относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве унифицированных дозровок для подлежащих лечению пациентов; каждая единица содержит предопределенное количество активного соединения, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем. Спецификация описанных в настоящем документе форм дозированных единиц продиктована и непосредственно зависит от: (а) уникальных характеристик активного соединения и конкретного терапевтического эффекта, который должен быть достигнут, и (б) ограничений, присущих в настоящей области техники смешивания такого активного соединения для лечения чувствительности у индивидуумов.

Для введения антитела дозировка составляет от приблизительно 0,0001 до 100 мг/кг и более обычно от 0,01 до 5 мг/кг массы тела хозяина. Например, дозы могут составлять 0,3 мг/кг массы тела, 1 мг/кг массы тела, 3 мг/кг массы тела, 5 мг/кг массы тела или 10 мг/кг массы тела или в пределах 1-10 мг/кг. Иллюстративная схема лечения предусматривает введение один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в четыре недели, один раз в месяц, один раз в 3 месяца или один раз в три-шесть месяцев. Согласно предпочтительному варианту осуществления антитело к TIGIT по изобретению вводят каждые две недели. Другие предпочтительные схемы дозирования для описанного в настоящем документе антитела к TIGIT предусматривают 1, 3 или 5 мг/кг массы тела при внутривенном введении, при этом антитело вводится с использованием одной из следующих схем дозирования: (i) каждые четыре недели в течение шести доз, затем каждые три месяца; (ii) каждые три недели; (iii) 3 мг/кг массы тела однократно, после чего следует 1 мг/кг массы тела каждые три недели.

Согласно некоторым способам осуществления одновременно вводят два или более моноклональных антитела с различной специфичностью связывания, и в этом случае доза каждого вводимого антитела попадает в указанные диапазоны. Терапевтическое антитело, как правило, вводят несколько раз. Интервалы между разовыми дозами могут составлять, например, неделю, месяц, три месяца или год. Интервалы также могут быть нерегулярными, как указано путем измерения содержания антител к антигену-мишени у пациента. В некоторых способах дозировка корректируется для достижения концентрации антитела в плазме приблизительно 1-1000 мкг/мл, а в некоторых способах приблизительно 25-300 мкг/мл.

Антитело можно вводить в виде композиции с замедленным высвобождением, и в этом случае требуется менее частое введение. Дозировка и частота варьируют в зависимости от периода полувыведения антитела у пациента. В общем, человеческие антитела показывают самый длинный период полувыведения, за которым следуют гуманизированные антитела, химерные антитела и отличные от человеческих антитела. Дозировка и частота введения могут варьировать в зависимости от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. В профилактических применениях относительно низкую дозировку вводят с относительно небольшими интервалами в течение длительного периода времени. Некоторые пациенты продолжают получать лечение всю оставшуюся жизнь. В терапевтических применениях иногда требуется относительно высокая дозировка с относительно короткими интервалами, пока прогрессия болезни не будет уменьшена или не прекращена, и предпочтительно до тех пор, пока пациент не продемонстрирует частичное или полное улучшение симптомов заболевания. После этого пациенту необязательно можно вводить профилактическую схему лечения, хотя во многих показаниях иммунной онкологии дальнейшее лечение не требуется.

Фактические уровни дозировки активных ингредиентов в описанных в настоящем документе фар-

мацевтических композициях могут варьировать, чтобы получить количество активного ингредиента, которое эффективно для достижения желаемого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения, не будучи токсичным для пациента. Выбранный уровень дозировки будет зависеть от множества фармакокинетических факторов, включая в себя активность конкретных описанных в настоящем документе композиций или их сложного эфира, соли или амида, способа введения, времени введения, скорости выделения конкретного используемого соединения, продолжительности лечения, других лекарственных средств, соединений и/или материалов, используемых в комбинации с конкретными используемыми составами, возраста, пола, массы, состояния, общего состояния здоровья и анамнеза подлежащего лечению пациента, и подобных факторов, хорошо известных в области медицины.

"Терапевтически эффективная доза" описанного в настоящем документе антитела к TIGIT предпочтительно приводит к уменьшению тяжести симптомов заболевания, увеличению частоты и продолжительности периодов без симптомов заболевания или предотвращению ухудшения или инвалидности из-за заболевания. В контексте злокачественной опухоли терапевтически эффективная доза предпочтительно предотвращает дальнейшее ухудшение физических симптомов, связанных со злокачественной опухолью. Симптомы злокачественной опухоли хорошо известны в настоящей области техники и включают в себя, например, необычные особенности родинок, изменение внешнего вида родинки, включая асимметрию, границу, цвет и/или диаметр, область недавно пигментированной кожи, аномальную родинку, затемненную область под ногтем, уплотнения в груди, изменения сосков, кисты груди, боль в груди, смерть, потерю веса, слабость, чрезмерную усталость, затрудненное питание, потерю аппетита, хронический кашель, ухудшение одышки, кашель с кровью, кровь в моче, кровь в стуле, тошноту, рвоту, метастазы в печени, метастазы в легких, метастазы в кости, ощущение переполнения желудка, вздутии живота, жидкость в брюшной полости, вагинальное кровотечение, запоры, растяжение брюшной полости, перфорацию толстой кишки, острый перитонит (инфекция, лихорадка, боль), рвоту, тяжелую потливость, лихорадку, повышенное кровяное давление, анемию, диарею, желтуху, головокружение, озноб, мышечные спазмы, метастазы в толстой кишке, метастазы в легкие, метастазы в мочевом пузыре, метастазы в печени, метастазы в кости, метастазы в почках и метастазы в поджелудочной железе, затруднение глотания и тому подобное. Терапевтическая эффективность может наблюдаться сразу после первого введения моноклонального антитела к huTIGIT по настоящему изобретению, или она может наблюдаться только через некоторое время и/или в виде серии доз. Такую отсроченную эффективность можно наблюдать только через несколько месяцев лечения, до 6, 9 или 12 месяцев. Крайне важно не решить преждевременно, что моноклональное антитело к huTIGIT по настоящему изобретению не обладает терапевтической эффективностью в свете замедленной эффективности, проявляемой некоторыми иммуноонкологическими средствами.

Терапевтически эффективная доза может предотвращать или замедлять начало злокачественной опухоли, например может потребоваться присутствие ранних или предварительных признаков заболевания. Лабораторные исследования, используемые при диагностике злокачественной опухоли, включают в себя химические вещества (включая в себя измерение содержания TIGIT), гематологию, серологию и радиологию. Соответственно, любой клинический или биохимический анализ, который контролирует любое из вышеизложенного, может быть использован для определения того, является ли конкретное воздействие терапевтически эффективной дозой для лечения злокачественной опухоли. Специалист в настоящей области техники может определить такие количества на основе таких факторов, как размер субъекта, степень тяжести симптомов субъекта и выбранного состава или способа введения.

Описанную в настоящем документе композицию можно вводить посредством одного или нескольких путей введения с использованием одного или нескольких из множества способов, известных в настоящей области техники. Как будет понятно специалисту в настоящей области техники, путь и/или способ введения будет варьировать в зависимости от желаемых результатов. Предпочтительные пути введения для описанных в настоящем документе антител включают в себя внутривенный, внутримышечный, внутрикожный, внутрибрюшинный, подкожный, спинальный или другой парентеральный путь введения, например, путем инъекции или инфузии.

Используемая в настоящем документе фраза "парентеральное введение" означает способы введения, отличные от энтерального и местного введения, как правило, путем инъекции, и включает в себя, без ограничения, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, интракапсулярную, внутриорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидную, интраспинальную, эпидуральную и внутрисуставную инъекцию и инфузию.

Альтернативно, описанное в настоящем документе антитело можно вводить с помощью непарентерального пути, такого как местный, эпидермальный или слизистый путь введения, например интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или местно.

Активные соединения могут быть получены с носителями, которые будут защищать соединение от быстрого высвобождения, например состав с контролируемым высвобождением, включая в себя имплантаты, трансдермальные пластыри и микрокапсулированные системы доставки. Могут использоваться биodeградируемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигли-

колевая кислота, коллаген, полиортоэфиры и полимолочная кислота. Многие способы получения таких составов запатентованы или известны специалистам в настоящей области техники. См., например, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Терапевтические композиции можно вводить с помощью медицинских устройств, известных в настоящей области техники. Например, согласно предпочтительному варианту осуществления описанная в настоящем документе терапевтическая композиция может вводиться посредством безыгольного инъектора для подкожных инъекций, такого как устройства, раскрытые в патентах США № 5399163; 5383851; 5312335; 5064413; 4941880; 4790824 или 4596556. Примеры известных имплантатов и модулей для использования с описанными в настоящем документе антителами к TIGIT включают в себя: патент США № 4487603, который раскрывает имплантируемый микроинфузионный насос для дозирования лекарственных средств с контролируемой скоростью; патент США № 4486194, который раскрывает терапевтическое устройство для введения лекарственных средств через кожу; патент США № 4447233, в котором раскрыт инфузионный насос лекарственного средства для доставки лекарственного средства с точной скоростью инфузии; патент США № 4447224, в котором раскрыт имплантируемый инфузионный прибор с регулируемым потоком для непрерывной доставки лекарственного средства; патент США № 4439196, который описывает осмотическую систему доставки лекарственного средства, имеющую многокамерные отсеки; и патент США № 4475196, который описывает осмотическую систему доставки лекарственного средства. Эти патенты включены в настоящий документ посредством ссылки. Многие другие такие имплантаты, системы доставки и модули известны специалистам в настоящей области техники.

Согласно некоторым вариантам осуществления описанные в настоящем документе антитела к TIGIT могут быть составлены для обеспечения правильного распределения *in vivo*. Например, гематоэнцефалический барьер (BBB) исключает многие высокогидрофильные соединения. Чтобы гарантировать, что описанные в настоящем документе терапевтические соединения пересекают BBB (при желании), их можно составить, например, в липосомах. Способы изготовления липосом см., например, в патентах США № 4522811; 5374548 и 5399331. Липосомы могут содержать один или несколько фрагментов, которые избирательно переносятся в определенные клетки или органы, таким образом, повышая нацеленную доставку лекарственного средства (см., например, V.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685). Иллюстративные нацеливающие фрагменты включают в себя фолат или биотин (см., например, патент США № 5416016 на имя Low et al.); маннозиды (Umezawa et al. (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038); антитела (P.G. Bloeman et al. (1995) FEBS Lett. 357:140; M. Owais et al. (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180); рецептор поверхностно-активного белка А (Briscoe et al. (1995) Am. J. Physiol. 1233:134); p120 (Schreier et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:9090); см. также K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273.

Х. Применения и способы.

Описанные в настоящем документе антитела, композиции и способы антител обладают многочисленными полезными свойствами *in vitro* и *in vivo*, включающими в себя, например, усиление иммунного ответа путем блокирования передачи сигналов TIGIT или обнаружения TIGIT. Согласно предпочтительному варианту осуществления описанные в настоящем документе антитела представляют собой человеческие или гуманизированные антитела. Например, описанные в настоящем документе антитела к TIGIT могут вводиться клеткам в культуре, *in vitro* или *ex vivo*, или субъектам-людям, например, *in vivo*, для усиления иммунитета при различных заболеваниях. Соответственно, в настоящем документе предусмотрены способы модификации иммунного ответа у субъекта, предусматривающие введение субъекту описанного в настоящем документе антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, так что иммунный ответ у субъекта усиливается, стимулируется или регулируется.

Предпочтительные субъекты включают в себя пациентов-людей, у которых было бы желательным усиление иммунного ответа. Способы особенно подходят для лечения пациентов-людей, страдающих от нарушения, которое можно лечить путем усиления иммунного ответа (например, опосредованного Т-клетками иммунного ответа). Согласно конкретному варианту осуществления способы особенно подходят для лечения злокачественной опухоли *in vivo*. Для достижения антигенспецифического усиления иммунитета описанные в настоящем документе антитела к TIGIT могут вводиться вместе с представляющим интерес антигеном, или антиген может уже присутствовать у подлежащего лечению пациента (например, несущего опухоль или вирус субъекта), когда антитела к TIGIT вводятся вместе с другим агентом, их можно вводить отдельно или одновременно.

Также охвачены способы обнаружения наличия антигена человека TIGIT в образце или измерение количества человеческого антигена TIGIT, предусматривающие контактирование образца и контрольного образца с человеческим моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, который специфически связывается с человеческим TIGIT в условиях, которые позволяют образовывать комплекс между антителом или его фрагментом и TIGIT человека. Затем обнаруживается образование комплекса, причем разница в образовании комплекса между образцом по сравнению с контрольным образцом свидетельствует о наличии в образце антигена TIGIT человека. Более того, описанные в настоящем документе антитела к TIGIT могут быть использованы для очистки человеческого TIGIT с помощью иммуноаффинной очистки.

Учитывая способность описанных в настоящем документе антител к TIGIT блокировать ингибирование или коингибирование ответов T-клеток, например антигенспецифических ответов T-клеток, в настоящем документе предусмотрены *in vitro* и *in vivo* способы применения описанных в настоящем документе антител для стимулирования, усиления или активации антигенспецифических T-клеточных ответов, например противоопухолевых T-клеточных ответов. Согласно некоторым вариантам осуществления также предусмотрена стимуляция CD3 (например, путем совместной инкубации с экспрессирующейся клеткой мембранным CD3), причем стимуляция может быть предусмотрена в одно и то же время, до или после лечения антителом к TIGIT. Например, в настоящем документе предусмотрены способы усиления антигенспецифического ответа T-клеток, предусматривающие контактирование указанной T-клетки с описанным в настоящем документе антителом к TIGIT и, необязательно, с CD3, так что антигенспецифический ответ T-клеток усиливается, например, путем удаления опосредованного TIGIT ингибирующего эффекта. Любой подходящий показатель антигенспецифического ответа T-клеток может быть использован для измерения антигенспецифического ответа T-клеток. Неограничивающие примеры таких подходящих индикаторов включают в себя повышенную пролиферацию T-клеток в присутствии антитела и/или увеличение производства цитокинов в присутствии антитела. Согласно предпочтительному варианту осуществления производство интерлейкина-2 и/или интерферона- γ антигенспецифической T-клеткой усиливается.

Кроме того, охвачены способы усиления иммунного ответа (например, антигенспецифического ответа T-клеток) у субъекта, предусматривающие введение описанного в настоящем документе антитела к TIGIT субъекту, так что иммунный ответ (например, антигенспецифический T-клеточный ответ) у субъекта усиливается. Согласно предпочтительному варианту осуществления субъект представляет собой содержащего опухоль субъекта, и иммунный ответ против опухоли усиливается. Опухоль может представлять собой солидную опухоль или жидкую опухоль, например гематологическое злокачественное новообразование. Согласно некоторым вариантам осуществления опухоль представляет собой иммуногенную опухоль. Согласно некоторым вариантам осуществления опухоль представляет собой неиммуногенную опухоль. Согласно некоторым вариантам осуществления опухоль представляет собой PD-L1 положительную опухоль. Согласно некоторым вариантам осуществления опухоль представляет собой PD-L1 отрицательную опухоль. Субъект также может быть носителем вируса, и иммунный ответ против вируса усиливается.

Дополнительно предусмотрены способы ингибирования роста опухолевых клеток у субъекта, предусматривающие введение субъекту описанного в настоящем документе антитела к TIGIT, так что рост опухоли у субъекта ингибируется. Также предусмотрены способы лечения хронической вирусной инфекции у субъекта, предусматривающие введение субъекту описанного в настоящем документе антитела к TIGIT, так что у субъекта лечится хроническая вирусная инфекция.

Кроме того, в настоящем документе охвачены способы истощения клеток T_{reg} из опухолевого микроокружения субъекта, характеризующегося наличием опухоли, например, злокачественной опухоли, предусматривающие введение субъекту терапевтически эффективного количества описанного в настоящем документе антитела к TIGIT, которое содержит Fc, который стимулирует истощение клеток T_{reg} в опухолевом микроокружении. Fc может представлять собой, например, Fc с эффекторной функцией или усиленной эффекторной функцией, такой как связывание или обладающее улучшенным связыванием с одним или несколькими активирующими рецепторами Fc. Согласно предпочтительному варианту осуществления истощение T_{reg} происходит без значительного истощения или ингибирования клеток T_{eff} в опухолевом микроокружении и без значительного истощения или ингибирования клеток T_{eff} и клеток T_{reg} за пределами опухолевого микроокружения. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект характеризуется более высокими уровнями TIGIT на клетках T_{reg} , чем на клетках T_{eff} , например, в опухолевом микроокружении. Согласно некоторым вариантам осуществления антитела к TIGIT могут истощать T_{reg} в опухолях и/или T_{reg} в инфильтрирующих лимфоциты опухолях (TIL). Например, в модели опухоли CT26 антитело к мышиному TIGIT, представленное в форме IgG2a мыши (которое проявляет эффекторную функцию), частично истощало как T_{reg} , так и $CD8^+$ T-клетки, но не истощало $CD4^+$ T-клетки. Неэффективное эквивалентное антитело к TIGIT, представленное в форме D265A IgG1 мыши, не истощало T-клетки. При рассмотрении вопроса о том, следует ли использовать эффекторную функцию или эффекторное антитело к TIGIT, следует учесть необходимость компромисса между истощением T_{reg} , которое может усилить противоопухолевый иммунный ответ, и истощением $CD8^+$ T-клеток, что устраняет некоторые из клеток, необходимые для фактического уничтожения опухолевых клеток. Хотя истощение T_{reg} может усилить противоопухолевую активность, недавние исследования продемонстрировали, что лигирование TIGIT на $TIGIT^+ T_{reg}$ способствует опосредуемой клетками T_{reg} клеточной супрессии пролиферации T_{eff} (Joller et al. (2014) *Immunity* 40:569), предполагая, что блокирование передачи сигналов TIGIT (например, использование антитела-антагониста к TIGIT по настоящему изобретению) также может усилить противоопухолевую активность. Соответственно, может быть наиболее эффективным использовать антитело-антагонист к TIGIT, лишённое эффекторной функции, которое: i) блокирует передачу сигналов TIGIT в T_{reg} , таким образом, уменьшая их иммуносупрессорную активность, ii) активирует противоопухолевые $CD8^+$ T-клетки, блокируя ингибирующие эффекты TIGIT, тогда как в то же время избегая их

истощения, вызванного эффекторной функцией, и iii) усиливает активацию, опосредованную DNAM, позволяя DNAM связываться с PVR, который в противном случае, был бы связан TIGIT (и путем уменьшения прямых взаимодействий TIGIT-DNAM) (Johnston et al. (2014) Cancer Cell 26:923).

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к TIGIT вводится субъекту в качестве дополнительной терапии. Лечение субъектов со злокачественной опухолью антителом к TIGIT, может привести к долгосрочному долговременному ответу относительно существующего стандартного лечения; долгосрочной выживаемости в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10 или более лет, безрецидивной выживаемости в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или 10 или более лет. Согласно некоторым вариантам осуществления лечение субъекта со злокачественной опухолью антителом к TIGIT, предотвращает рецидив злокачественной опухоли или задерживает рецидив злокачественной опухоли, например, на 1, 2, 3, 4, 5 или 10 или более лет. Лечение анти-TIGIT можно использовать в качестве первичной или вторичной линии лечения.

Эти и другие описанные в настоящем документе способы более подробно обсуждаются ниже.

Злокачественная опухоль.

Блокирование передачи сигналов PVR/нектин-2 через TIGIT антителами к TIGIT может усиливать иммунный ответ на злокачественные клетки у пациента. Приведенные в настоящем документе способы лечения субъекта со злокачественной опухолью предусматривают введение субъекту описанного в настоящем документе антитела к TIGIT таким образом, что субъект подвергается лечению, например, таким образом, что рост злокачественных опухолей ингибируется или снижается и/или что опухоли регрессируют. Антитело к TIGIT можно использовать отдельно, чтобы ингибировать рост злокачественных опухолей. Альтернативно, антитело к TIGIT можно использовать в сочетании с другим средством, например с другими иммуногенными средствами, стандартными способами лечения злокачественной опухоли или другими антителами, как описано ниже. Также предусмотрена комбинация с ингибитором PD-1, таким как антитело к PD-1 или к PD-L1.

Соответственно, в настоящем документе предусмотрены способы лечения злокачественной опухоли, например, путем ингибирования роста опухолевых клеток у субъекта, предусматривающие введение субъекту терапевтически эффективного количества описанного в настоящем документе антитела к TIGIT, например 15A6, 22G2, 11G11 или 10D7, или его антигенсвязывающего фрагмента. Антитело может представлять собой антитело к TIGIT человека (такое как любое описанное в настоящем документе антитело к huTIGIT человека), или оно может представлять собой химерное или гуманизированное антитело к huTIGIT человека, например химерное или гуманизированное антитело к TIGIT, которое конкурирует за связывание или связывается с тем же эпитопом, что и по меньшей мере одно из описанных в настоящем документе антител к TIGIT.

Злокачественные опухоли, рост которых можно ингибировать с использованием антител по настоящему изобретению, включают в себя злокачественные опухоли, как правило, отвечающие на иммунотерапию. Неограничивающие примеры злокачественных опухолей для лечения включают в себя плоскоклеточную карциному, мелкоклеточную злокачественную опухоль легкого, немелкоклеточную злокачественную опухоль легкого, плоскоклеточную злокачественную опухоль легкого (NSCLC), не NSCLC глиому, злокачественную опухоль желудочно-кишечного тракта, злокачественную опухоль почки (например, светлоклеточную карциному), злокачественную опухоль яичников, злокачественную опухоль печени, злокачественную опухоль толстой и прямой кишки, злокачественную опухоль эндометрия, злокачественную опухоль почки (например, карциному почки (RCC)), злокачественную опухоль предстательной железы (например, гормональную рефрактерную аденокарциному предстательной железы), злокачественную опухоль щитовидной железы, нейробластому, злокачественную опухоль поджелудочной железы, глиобластому (мультиформную глиобластому), злокачественную опухоль шейки матки, злокачественную опухоль желудка, злокачественную опухоль мочевого пузыря, гепатому, злокачественную опухоль молочной железы, карциному толстой кишки и злокачественную опухоль головы и шеи (или карциному), злокачественную опухоль желудка, опухоль зародышевых клеток, педиатрическую саркому, синоназальную опухоль, меланому (например, метастатическую злокачественную меланому, такую как кожная или внутриглазная злокачественная меланома), злокачественную опухоль кости, злокачественную опухоль кожи, злокачественную опухоль матки, злокачественную опухоль анальной области, злокачественную опухоль яичка, карциному фаллопиевых труб, карциному эндометрия, карциному шейки матки, карциному влагалища, карциному вульвы, злокачественную опухоль пищевода, злокачественную опухоль тонкой кишки, злокачественную опухоль эндокринной системы, злокачественную опухоль щитовидной железы, злокачественную опухоль надпочечников, саркому мягких тканей, злокачественную опухоль мочеиспускательного канала, злокачественную опухоль полового члена, детские солидные опухоли, злокачественную опухоль мочеточника, карциному почечной лоханки, новообразование центральной нервной системы (ЦНС), первичную лимфому ЦНС, ангиогенез опухоли, опухоль позвоночной оси, глиому ствола головного мозга, аденому гипофиза, саркому Капоши, эпидермоидную злокачественную опухоль, плоскоклеточную злокачественную опухоль, Т-клеточную лимфому, вызванные окружающей средой злокачественные опухоли, в том числе индуцированные асбестом, связанные с вирусами злокачественные опухоли (например, опухоль, связанная с вирусом папилломы человека (ВПЧ)), и гематологи-

ческие злокачественные новообразования, происходящих от одной из двух основных линий клеток крови, т.е. линии миелоидных клеток (которая производит гранулоциты, эритроциты, тромбоциты, макрофаги и тучные клетки) или линии лимфоидных клеток (которая производит В, Т, NK и плазмоциты), такие как все типы лейкозов, лимфом и миелом, например острый, хронический, лимфоцитарный и/или миелогенный лейкоз, такие как острый лейкоз (ALL), острый миелолейкоз (AML), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ) и хронический миелогенный лейкоз (ХМЛ), недифференцированный АМЛ (M0), миелобластный лейкоз (M1), миелобластный лейкоз (M2, с созреванием клеток), промиелоцитарный лейкоз (M3 или вариант M3 [M3V]), миеломоноцитарный лейкоз (M4 или вариант M4 с эозинофилией [M4E]), моноцитарный лейкоз (M5), эритролейкоз (M6), мегакарибластный лейкоз (M7), изолированная гранулоцитарная саркома и хлорома; такие лимфомы, как лимфома Ходжкина (HL), неходжкинскую лимфому (НХЛ), В-клеточные лимфомы, Т-клеточные лимфомы, лимфоплазматическую лимфому, моноцитотидную В-клеточную лимфому, связанную со слизистой оболочкой лимфому лимфоидной ткани (MALT), анапластическую (например, Ki 1+) крупноклеточную лимфому, взрослую Т-клеточную лимфому/лейкоз, мантийноклеточную лимфому, ангио-иммунобластную Т-клеточную лимфому, ангиоцентрическую лимфому, кишечную Т-клеточную лимфому, первичную медиастинальную В-клеточную лимфому, Т-лимфобластную лимфому предшественников, и Т-лимфобластную лимфому/лейкоз (T-Lbly/T-ALL), периферическую Т-клеточную лимфому, лимфобластную лимфому, посттрансплантационное лимфопролиферативное нарушение, истинную гистиоцитарную лимфому, первичную лимфому центральной нервной системы, первичную эффузионную лимфому, лимфобластную лимфому (LBL), гемопоэтические опухоли лимфоидной линии, острый лимфобластный лейкоз, диффузную В-крупноклеточную лимфому, лимфому Беркитта, фолликулярную лимфому, диффузную гистиоцитарную лимфому (DHL), иммунобластную крупноклеточную лимфому, В-лимфобластную лимфому предшественников, кожную Т-клеточную лимфому (CTLC) (также называемую грибовидными микозами или синдромом Сезари) и лимфоплазматикоидную лимфому (LPL) с макроглобулинемией Вальденстрема; такие миеломы, как миелому IgG, миелому легкой цепи, несекреторную миелому, вялотекущую миелому (также называемую невыраженной миеломой), одиночную плазмоцитому и множественные миеломы, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), лимфому "волосатых" клеток; гематопоэтические опухоли миелоидной линии, опухоли мезенхимного происхождения, включая в себя фибросаркому и рабдомиосаркому; семиному, тератокарциному, опухоли центральной и периферической нервной системы, включая в себя астроцитому, шванномы; опухоли мезенхимного происхождения, включая в себя фибросаркому, рабдомиосаркому и остеосаркому; и другие опухоли, включая в себя меланому, пигментную ксеродермию, кератоакантому, семиному, злокачественную опухоль щитовидной железы и тератокарциному, гемопоэтические опухоли лимфоидной линии, например Т-клеточные и В-клеточные опухоли, включая в себя, без ограничения, такие нарушения Т-клеток, как Т-пролимфоцитарный лейкоз (T-PLL), включая в себя мелкоклеточные и церебральные клеточные типы; крупнозернистый лимфоцитарный лейкоз (LGL), предпочтительно Т-клеточного типа; a/d Т-NHL гепатоспленарную лимфому; периферическую/посттимическую Т-клеточную лимфому (плеоморфные и иммунобластные подтипы); ангиоцентрическую (назальную) Т-клеточную лимфому; злокачественную опухоль головы или шеи, злокачественную опухоль почек, злокачественную опухоль прямой кишки, злокачественную опухоль щитовидной железы; острую миелоидную лимфому, а также любые комбинации указанных видов злокачественной опухоли. Описанные в настоящем документе способы могут также применяться для лечения метастатических злокачественных опухолей, рефрактерных злокачественных опухолей (например, злокачественной опухоли, рефрактерных к предыдущей иммунотерапии, например с блокирующим CTLA-4 или PD-1-антителом) и рецидивирующих злокачественных опухолей.

Антитело к TIGIT можно вводить в виде монотерапии или в виде единственной иммуностимулирующей терапии или его можно комбинировать с иммуногенным средством, таким как злокачественные клетки, очищенные опухолевые антигены (включая в себя рекомбинантные белки, пептиды и углеводные молекулы), или клетки, трансфицированные генами, кодирующими иммуностимулирующие цитокины, в стратегии противораковой вакцины (He et al. (2004) *J. Immunol.* 173:4919-28). Неограничивающие примеры опухолевых вакцин, которые могут быть использованы, включают в себя пептиды антигенов меланомы, такие как пептиды gp100, антигены MAGE, Trp-2, MART1 и/или тирозиназу, или опухолевые клетки, трансфицированные чтобы экспрессировать цитокин GM-CSF.

Было разработано много экспериментальных стратегий вакцинации против опухолей (см. Rosenberg S., 2000, *Development of Cancer Vaccines*, ASCO Educational Book Spring: 60-62; Logothetis C., 2000, *ASCO Educational Book Spring*: 300-302; Khayat D., 2000, *ASCO Educational Book Spring*: 414-428; Foon K., 2000, *ASCO Educational Book Spring*: 730-738, см. также Restifo N. and Sznol M., *Cancer Vaccines*, Ch. 61, pp. 3023-3043 in DeVita et al. (eds.), 1997, *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, Fifth Edition). В одной из этих стратегий вакцину готовят с использованием аутологичных или аллогенных опухолевых клеток. Было показано, что эти клеточные вакцины наиболее эффективны, когда опухолевые клетки трансдуцируют для экспрессии GM-CSF. Было показано, что GM-CSF представляет собой мощный активатор презентации антигена для вакцинации опухолей (Dranoff et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 3539-43).

Изучение экспрессии генов и крупномасштабных профилей экспрессии генов в различных опухо-

лях привело к определению так называемых опухолеспецифических антигенов (Rosenberg S.A. (1999) *Immunity* 10: 281-7). Во многих случаях эти опухолеспецифические антигены представляют собой антигены дифференцировки, экспрессируемые в опухолях и в клетке, из которой возникла опухоль, например антигены меланоцитов gp100, антигены MAGE и Trp-2. Что еще более важно, можно показать, что многие из этих антигенов представляют собой мишени опухолеспецифических Т-клеток, обнаруженных в хозяине. Ингибирование TIGIT можно использовать в сочетании с набором рекомбинантных белков и/или пептидов, экспрессированных в опухоли, чтобы получить иммунный ответ на эти белки. Эти белки, как правило, просматриваются иммунной системой как аутоантигены и поэтому терпимы к ним. Опухолевый антиген может включать в себя белок теломеразу, который необходим для синтеза теломер хромосом и который экспрессируется более чем в 85% случаев злокачественной опухоли человека и только в ограниченном числе соматических тканей (Kim et al. (1994) *Science* 266: 2011-2013). Опухолевый антиген может также представлять собой "неоантигены", экспрессируемые в злокачественных клетках из-за соматических мутаций, которые изменяют последовательность белка или создают слитые белки между двумя несвязанными последовательностями (например, bcr-abl в хромосоме Филадельфия) или идиотипом из опухолей В-клеток.

Другие опухолевые вакцины могут включать в себя белки от вирусов, вовлеченных в злокачественные опухоли человека, таких как вирусы папилломы человека (HPV), вирусы гепатита (HBV и HCV) и вирус саркомы герпеса Капоши (KHSV). Другая форма опухолеспецифического антигена, которую можно использовать в сочетании с ингибированием TIGIT, представляет собой очищенные белки теплового шока (HSP), выделенные из самой опухолевой ткани. Эти белки теплового шока содержат фрагменты белков из опухолевых клеток, и эти HSP обладают высокой эффективностью при доставке в антигенпрезентирующие клетки для проявления опухолевого иммунитета (Suot & Srivastava (1995) *Science* 269:1585-1588; Tamura et al. (1997) *Science* 278:117-120).

Дендритные клетки (DC) представляют собой сильные антигенпрезентирующие клетки, которые могут быть использованы для первичных антигенспецифических ответов. DC могут быть получены *ex vivo* и загружены различными белковыми и пептидными антигенами, а также экстрактами опухолевых клеток (Nestle et al. (1998) *Nature Medicine* 4: 328-332). DC также могут быть трансдуцированы генетическими средствами для экспрессии этих опухолевых антигенов. DC также были слиты непосредственно с опухолевыми клетками в целях иммунизации (Kugler et al. (2000) *Nature Medicine* 6:332-336). В качестве способа вакцинации иммунизация DC может быть эффективно объединена с блокировкой TIGIT для активации (высвобождения) более мощных противоопухолевых ответов.

Ингибирование TIGIT можно также комбинировать со стандартными способами лечения злокачественной опухоли (например, хирургией, радиацией и химиотерапией). Ингибирование TIGIT можно эффективно комбинировать с химиотерапевтическими схемами лечения. В этих случаях возможно уменьшение дозы вводимого химиотерапевтического реагента (Mokyr et al. (1998) *Cancer Research* 58: 5301-5304). Примером такой комбинации является антитело к TIGIT в комбинации с декарбазином для лечения меланомы. Другим примером такой комбинации является антитело к TIGIT в комбинации с интерлейкином-2 (IL-2) для лечения меланомы. Научное обоснование комбинированного применения ингибирования TIGIT и химиотерапии заключается в том, что гибель клеток, которая представляет собой следствие цитотоксического действия большинства химиотерапевтических соединений, должна приводить к увеличению уровней опухолевого антигена в антигенпрезентирующем пути. Другая комбинированная терапия, которая может привести к синергии с ингибированием TIGIT посредством клеточной смерти, - это радиация, хирургия и выключение эндокринной функции. Каждый из этих протоколов создает источник опухолевого антигена в хозяине. Ингибиторы ангиогенеза также можно комбинировать с ингибированием TIGIT. Ингибирование ангиогенеза приводит к гибели опухолевых клеток, которые могут подавать опухолевый антиген в антигенпрезентирующие пути хозяина.

Описанные в настоящем документе антитела к TIGIT также могут быть использованы в комбинации с биспецифическими антителами, которые нацеливают экспрессирующие рецепторы Fc α или Fc γ эффекторные клетки на опухолевые клетки (см., например, патенты США № 5922845 и 5837243). Биспецифические антитела можно использовать для нацеливания на два отдельных антигена. Например, биспецифические антитела к Fc-рецептору/противоопухолевому антигену (например, Her-2/neu) использовали для нацеливания макрофагов на опухолевые сайты. Это нацеливание может более эффективно активировать опухолеспецифические ответы. Т-клеточное плечо этих ответов было бы дополнено ингибированием TIGIT. Альтернативно, антиген может быть доставлен непосредственно в DC с использованием биспецифических антител, которые связываются с опухолевым антигеном и специфическим к дендритным клеткам маркером клеточной поверхности.

Опухоли уклоняются от иммунного надзора хозяина с помощью большого числа механизмов. Многие из этих механизмов могут быть преодолены путем инактивации иммуносупрессивных белков, экспрессируемых опухолями. К ним относятся, в частности, TGF- β (Kehrl et al. (1986) *J. Exp. Med* 163: 1037-1050), IL-10 (Howard & O'Garra (1992) *Immunology Today* 13: 198-200) и Fas-лиганд (Hahne et al. (1996) *Science* 274: 1363-1365). Антитела к каждому из этих объектов могут использоваться в комбинации с ан-

тителами к TIGIT для противодействия эффектам иммунодепрессантов и для поддержки опухолевых иммунных ответов хозяином.

Другие антитела, которые активируют иммунологическую реактивность хозяина, могут использоваться в комбинации с антителами к TIGIT. К ним относятся молекулы на поверхности дендритных клеток, которые активируют функцию DC и презентацию антигена. Антитела к CD40 способны эффективно замещать хелперную активность Т-клеток (Ridge et al. (1998) *Nature* 393: 474-478) и могут использоваться в сочетании с антителами к TIGIT. Активация антител к костимулирующим молекулам Т-клеток, таким как OX-40 (Weinberg et al. (2000) *Immunol* 164: 2160-2169), CD137/4-1BB (Melero et al. (1997) *Nature Medicine* 3: 682-685 (1997) и ICOS (Hutloff et al. (1999) *Nature* 397: 262-266), также может обеспечивать повышенные уровни активации Т-клеток.

Ингибиторы PD-1 или PD-L1 или CTLA-4 (например, патент США № 5811097), могут также использоваться в сочетании с антителами к TIGIT.

В настоящее время трансплантация костного мозга используется для лечения различных опухолей гемопэтического происхождения. В то время как заболевание трансплантат против хозяина является следствием этого лечения, терапевтическая польза может быть получена от реакции трансплантата против опухоли. Ингибирование TIGIT можно использовать для повышения эффективности трансплантированных от донора опухолеспецифических Т-клеток.

Существует также несколько экспериментальных протоколов лечения, которые включают в себя активацию *ex vivo* и размножение антигенспецифических Т-клеток и адоптивный перенос этих клеток реципиентам для стимуляции антигенспецифических Т-клеток против опухоли (Greenberg & Riddell (1999) *Science* 285: 546-51). Эти способы также могут быть использованы для активации ответов Т-клеток на инфекционные патогены, такие как ЦМВ. Активация *ex vivo* в присутствии антител к TIGIT может увеличить частоту и активность адоптивно перенесенных Т-клеток.

Хронические вирусные инфекции.

Согласно другому аспекту в описанном в настоящем документе изобретении предусмотрен способ лечения инфекционного заболевания у субъекта, предусматривающий введение субъекту антитела к TIGIT или его антигенсвязывающего фрагмента, так что субъект подвергается лечению от инфекционного заболевания.

Подобно его применению к опухолям, как обсуждалось выше, опосредуемое антителом ингибирование TIGIT может использоваться отдельно или в качестве адъюванта в сочетании с вакцинами для усиления иммунного ответа на патогены, токсины и аутоантигены. Примеры патогенов, для которых этот терапевтический подход может быть особенно применим, включают в себя, без ограничения, ВИЧ, гепатит (А, В и С), грипп, герпес, лямблиоз, малярию, лейшманию, стафилококк, *Pseudomonas aeruginosa*. Ингибирование TIGIT особенно применимо против установленных инфекций такими агентами, как ВИЧ, которые представляют собой измененные антигены при этих инфекциях. Эти новые эпитопы распознаются как чужеродные во время введения антител к человеческому TIGIT, что вызывает сильный ответ Т-клеток.

Некоторые примеры патогенных вирусов, вызывающих инфекции, поддающиеся лечению с помощью описанных в настоящем документе способов, включают в себя ВИЧ, гепатит (А, В или С), вирус герпеса (например, VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II и CMV, вирус Эпштейна Барра), аденовирус, вирус гриппа, флавивирусы, эховирус, риновирус, вирус коксаки, коронавирусы, респираторно-синцитиальный вирус, вирус паротита, ротавирус, вирус кори, вирус краснухи, парвовирус, вирус коровьей оспы, вирус HTLV, вирус денге, папилломавирус, вирус моллюска, полиовирус, вирус бешенства, вирус JC и вирус арбовирусного энцефалита.

Некоторые примеры патогенных бактерий, вызывающих инфекции, поддающиеся лечению описанными в настоящем документе способами, включают в себя хламидии, риккетсиальные бактерии, микобактерии, стафилококки, стрептококки, пневмококки, менингококки и гонококки, клебсиелла, протеус, серацию, псевдомонаду, легионеллу, дифтерию, сальмонеллу, бациллу, холеру, столбняк, ботулизм, сибирскую язву, чуму, лептоспироз и бактерии болезни Лайма.

Некоторые примеры патогенных грибов, вызывающих инфекции, поддающиеся лечению с помощью описанных в настоящем документе способов, включают в себя *Candida* (*albicans*, *krusei*, *glabrata*, *tropicalis* и т.д.), *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* (*fumigatus*, *niger* и т.д.), Genus *Mucorales* (*mucor*, *absidia*, *rhizopus*), *Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* и *Histoplasma capsulatum*.

Некоторые примеры патогенных паразитов, вызывающих инфекции, поддающиеся лечению описанными в настоящем документе способами, включают в себя *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* sp., *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* sp., *Pneumocystis carinii*, *Plasmodium vivax*, *Babesia microti*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, *Nippostrongylus brasiliensis*.

Во всех вышеперечисленных способах ингибирование TIGIT можно комбинировать с другими формами иммунотерапии, такими как воздействие цитокинами (например, интерферонами, GM-CSF, G-CSF, IL-2) или терапия биспецифическим антителом, которая обеспечивает усиленную презентацию

опухолевыми антигенами (см., например, Holliger (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak (1994) Structure 2:1121-1123).

Адьюванты вакцин.

Описанные в настоящем документе антитела к TIGIT могут быть использованы для усиления антигенспецифических иммунных ответов путем совместного введения антитела к TIGIT с представляющим интерес антигеном (например, вакциной). Соответственно, в документе представлены способы усиления иммунного ответа на антиген у субъекта, предусматривающие введение субъекту: (i) антигена и (ii) антитела к TIGIT или его антигенсвязывающего фрагмента, так что иммунный ответ на антигену субъекта усиливается. Антигеном может быть, например, опухолевый антиген, вирусный антиген, бактериальный антиген или антиген из патогена. Неограничивающие примеры таких антигенов включают в себя те, которые обсуждались в разделах выше, такие как рассмотренные выше опухолевые антигены (или опухолевые вакцины) или антигены от вирусов, бактерий или других патогенов, описанных выше.

Согласно некоторым вариантам осуществления пептид или слитый белок, содержащий эпитоп, с которым связывается антитело к TIGIT, используют в качестве вакцины вместо антитела к TIGIT или в дополнение к нему.

Подходящие пути введения композиций описанных в настоящем документе антител (например, человеческих моноклональных антител, мультиспецифических и биспецифических молекул и иммуноконъюгатов) *in vivo* и *in vitro*, хорошо известны в настоящей области техники и могут быть выбраны рядовыми специалистами. Например, композиции антител можно вводить путем инъекции (например, внутривенной или подкожной). Подходящие дозировки используемых молекул будут зависеть от возраста и массы субъекта и от концентрации и/или состава композиции антитела.

Как описано выше, описанные в настоящем документе антитела к TIGIT могут вводиться совместно с одним или несколькими другими терапевтическими средствами, например цитотоксическим средством, радиотоксическим средством или иммунодепрессантом. Антитело может быть связано со средством (в виде иммунокомплекса) или может быть введено отдельно от средства. В последнем случае (отдельное введение) антитело может вводиться до, после или одновременно со средством или может быть совместно введено с другими известными способами лечения, например противоопухолевой терапией, например излучением. Такие терапевтические средства включают в себя, среди прочего, такие противоопухолевые средства, как доксорубин (адриамицин), сульфат цисплатина блеомицина, кармустин, хлорамбуцил, дакарбазин и гидроксифосфат циклофосфида, которые сами по себе эффективны только при таком содержании, которое токсично или субтоксично для пациента. Цисплатин вводят внутривенно в дозе 100 мг/мл один раз в четыре недели, а адриамицин вводят внутривенно в дозе 60-75 мг/мл один раз каждый 21 день. Совместное введение описанных в настоящем документе антител к TIGIT или их антигенсвязывающих фрагментов с помощью химиотерапевтических средств обеспечивает два противоопухолевых средства, которые действуют с помощью разных механизмов, чтобы получить цитотоксический эффект для опухолевых клеток человека. Такое совместное введение может решить проблемы из-за развития резистентности к лекарственным средствам или изменения антигенности опухолевых клеток, что делает их неактивными с антителом.

Также в пределах описанного в настоящем документе объема находятся наборы, содержащие описанные в настоящем документе композиции антител (например, человеческие антитела, биспецифические или мультиспецифические молекулы или иммуноконъюгаты) и инструкции по применению. Набор может дополнительно содержать по меньшей мере один дополнительный реагент или одно или несколько дополнительных описанных в настоящем документе человеческих антител (например, человеческое антитело, имеющее комплементарную активность, которое связывается с эпитопом в антигене TIGIT, отличным от первого человеческого антитела). Наборы, как правило, включают в себя этикетку, указывающую на предполагаемое использование содержимого набора. Термин "этикетка" включает в себя любую запись или записанный материал, поставляемый на комплекте или с комплектом, или который в противном случае прилагается к комплекту.

Комбинированная терапия.

В дополнение к описанным выше комбинациям описанные в настоящем документе антитела к TIGIT могут также использоваться в комбинированной терапии, например, для лечения описанной ниже злокачественной опухоли.

Настоящее изобретение относится к способам комбинированной терапии, в которых антитело к TIGIT вводят совместно с одним или несколькими дополнительными средствами, например антителами, которые эффективны для стимуляции иммунных ответов, чтобы таким образом дополнительно усилить, стимулировать или активировать иммунные ответы у субъекта. Как показано в примере 7 и на фиг. 5A и 5B, введение антагонистического антитела к TIGIT и антагонистического антитела к PD-1 мышам характеризовалось улучшенным эффектом в ингибировании роста опухоли.

Как правило, описанное в настоящем документе антитело к TIGIT может быть комбинировано с (i) агонистом костимулирующего рецептора и/или (ii) антагонистом ингибирующего сигнала на T-клетках, каждый из которых приводит к усилению антигенспецифических ответов T-клеток (регуляторов иммунной контрольной точки). Большинство из костимулирующих и коингибирующих молекул представляют

собой представителей суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF), и описанные в настоящем документе антитела к TIGIT могут вводиться с помощью средства, которое нацеливается на представителя семейства IgSF для усиления иммунного ответа. Одним из важных семейств связанных с мембраной лигандов, которые связываются с костимулирующими или коингибирующими рецепторами, является семейство B7, которое включает в себя B7-1, B7-2, B7-H1 (PD-L1), B7-DC (PD-L2), B7-H2 (ICOS-L), B7-H3, B7-H4, B7-H5 (VISTA) и B7-H6. Другим семейством лигандов, связанных с мембраной, которые связываются с костимулирующими или коингибирующими рецепторами, является семейство молекул TNF, которые связываются с родственными представителями семейства рецепторов TNF, которые включают в себя CD40 и CD40L, OX-40, OX-40L, CD70, CD27L, CD30, CD30L, 4-1BBL, CD137/4-1BB, TRAIL/Apo2-L, TRAILR1/DR4, TRAILR2/DR5, TRAILR3, TRAILR4, OPG, RANK, RANKL, TWEAKR/Fn14, TWEAK, BAFFR, EDAR, XEDAR, TACI, APRIL, BCMA, LT(3R, LIGHT, DcR3, HVEM, VEGI/TL1A, TRAMP/DR3, EDAR, EDA1, XEDAR, EDA2, TNFR1, лимфотоксин α 1 β 2, FAS, FASL, RELT, DR6, TROY, NGFR (см., например, Tansey (2009) Drug Discovery Today 00:1).

Активация Т-клеток также регулируется растворимыми цитокинами. Таким образом, антитела к TIGIT могут использоваться в комбинации с (i) антагонистами (или ингибиторами или блокирующими средствами) белков семейства IgSF или семейства B7, или семейства TNF, которые ингибируют активацию Т-клеток, или антагонистами цитокинов, которые ингибируют активацию Т-клеток (например, IL-6, IL-10, TGF- β , VEGF или другие иммуносупрессивные цитокины) и/или (ii) агонистами стимулирующих рецепторов семейства IgSF, семейства B7 или семейства TNF или цитокинов, которые стимулируют активацию Т-клеток для стимуляции иммунного ответа, например, для лечения пролиферативных заболеваний, таких как злокачественная опухоль.

Согласно одному аспекту Т-клеточные ответы могут стимулироваться комбинацией моноклонального антитела к TIGIT по настоящему изобретению и одного или нескольких (i) антагонистов белка, который ингибирует активацию Т-клеток (например, ингибиторы иммунной контрольной точки), таких как CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG-3, TIM-3, галектин 9, CEACAM-1, BTLA, CD69, галектин-1, CD113, GPR56, VISTA, 2B4, CD48, GARP, PD1H, LAIR1, TIM-1, CD96 (публикация международной заявки WO 2015/024060, Bernhardt et al. (2014) Nat. Immunol. 15:406) и TIM-4, и (ii) агониста белка, который стимулирует активацию Т-клеток, таких как B7-1, B7-2, CD28, 4-1BB (CD137), 4-1BBL, ICOS, CD40, ICOS-L, OX40, OX40L, GITR, GITRL, CD70, CD27, CD40, DR3 и CD28H.

Иллюстративные средства, которые модулируют один из вышеуказанных белков и могут быть объединены с агонистическими антителами к TIGIT, например, описанными в настоящем документе, для лечения злокачественной опухоли, включают в себя: YERVOY®/ипилимумаб или тремелимумаб (к CTLA-4), галиксимаб (к B7.1), OPDIVO®/ниволумаб/BMS-936558 (к PD-1), пидилизумаб/CT-011 (к PD-1), KEYTRUDA®/пембролизумаб/MK-3475 (к PD-1), AMP224 (к B7-DC/PD-L2), BMS-936559 (к B7-H1), MPDL3280A (к B7-H1), MEDI-570 (к ICOS), AMG557 (к B7H2), MGA271 (к B7H3 - WO 11/109400), IMP321 (к LAG-3), урелумаб/BMS-663513 и PF-05082566 (к CD137/4-1BB), CDX-1127 (к CD27), MEDI-6383 и MEDI-6469 (к OX40), RG -7888 (к OX40L - WO 06/029879), атацицепт (к TACI), CP-870893 (к CD40), лукатумумаб (к CD40), дацетузумаб (к CD40) и муромонаб-CD3 (к CD3).

Другие молекулы, которые могут быть объединены с антагонистическими антителами к TIGIT для лечения злокачественной опухоли, включают в себя антагонистов ингибирующих рецепторов на NK-клетках или агонистов активирующих рецепторов на NK-клетках. Например, антагонистические антитела к TIGIT могут быть объединены с антагонистами KIR (например, лирилумабом).

Другие средства для комбинированной терапии включают в себя средства, которые ингибируют или истощают макрофаги или моноциты, включая в себя, без ограничения, таких антагонистов CSF-1R, как антагонисты CSF-1R, включая в себя RG7155 (публикации международных заявок WO 11/70024, WO 11/107553, WO 11/131407, WO 13/87699, WO 13/119716, WO 13/132044) или FPA-008 (WO 11/140249, WO 13169264, WO 14/036357).

Как правило, описанные в настоящем документе антагонистические антитела к TIGIT могут использоваться вместе с одним или несколькими средствами-агонистами, которые лигируют положительные костимулирующие рецепторы, блокирующими средствами, которые ослабляют передачу сигналов через ингибирующие рецепторы, и одним или несколькими средствами, которые систематически увеличивают частоту противоопухолевых Т-клеток, средствами, которые преодолевают различные иммунные супрессивные пути в опухолевом микроокружении (например, блокируют включение ингибирующего рецептора (например, взаимодействия PD-L1/PD-1), истощают или ингибируют T_{reg} (например, используя моноклональное антитело к CD25 (например, даклизумаб) или ex vivo измельчение шариков к CD25), ингибируют метаболические ферменты, такие как IDO, или обращают/предотвращают толерантность или истощение Т-клеток), и средствами, которые вызывают врожденную иммунную активацию и/или воспаление в опухолевых сайтах.

Предлагаемые в настоящем документе способы стимуляции иммунного ответа у субъекта предусматривают введение субъекту молекулы-антагониста к TIGIT, например антитела, и одного или нескольких дополнительных иммуностимулирующих антител, таких как антагонист PD-1, например анта-

гонистическое антитело, антагонист PD-L1, например антагонистическое антитело, антагонист CTLA-4, например антагонистическое антитело, и/или антагонист LAG3, например антагонистическое антитело, таким образом, что иммунный ответ стимулируется у субъекта, например, для ингибирования роста опухоли или для стимуляции антивирусного ответа. Согласно одному варианту осуществления субъекту вводят антагонистическое антитело к TIGIT и антагонистическое антитело к PD-1. Согласно одному варианту осуществления субъекту вводят антагонистическое антитело к TIGIT и антагонистическое антитело к PD-L1. Согласно одному варианту осуществления субъекту вводят антагонистическое антитело к TIGIT и антагонистическое антитело к CTLA-4. Согласно одному варианту осуществления по меньшей мере одно дополнительное иммуностимулирующее антитело (например, к PD-1, к PD-L1, к CTLA-4 и/или к LAG3) представляет собой человеческое антитело. Альтернативно, по меньшей мере одно дополнительное иммуностимулирующее антитело может представлять собой, например, химерное или гуманизированное антитело, например, полученное из мышинового антитела к PD-1, к PD-L1, к CTLA-4 и/или к LAG3.

В настоящем документе предусмотрены способы лечения гиперпролиферативного заболевания (например, злокачественной опухоли), предусматривающие введение антагонистического антитела к TIGIT и антагонистического антитела к PD-1 субъекту. TIGIT и PD-1 коэкспрессируются в меланоме (Chauvin et al. (2015) J. Clin. Invest. 125:2046), а также коэкспрессируются на относительно высоких уровнях на CD8⁺ TILS от пациентов с немелкоклеточной злокачественной опухолью легкого (NSCLC) и пациентов с почечной карциномой (RCC). См. табл. 2 (показывающую процент клеток TIGIT⁺/PD-1⁺ в процентах от общего количества CD3⁺CD8⁺ TILS для образцов от нескольких пациентов).

Таблица 2. Процент TIGIT⁺/PD-1⁺ TILS в злокачественных опухолях

Образец	%TIGIT ⁺ /PD-1 ⁺
NSCLC-1	13
NSCLC-3	5,8
NSCLC-4	37,4
NSCLC-5	14,6
NSCLC-6	49,1
NSCLC-7	57,8
NSCLC-8	50,5
NSCLC-9	21
RCC-002	25,5
RCC-003	65,6
RCC-006	20,5

Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к TIGIT вводят в субтерапевтической дозе, антитело к PD-1 вводят в субтерапевтической дозе или оба вводят в субтерапевтической дозе. Также в настоящем документе представлены способы для изменения неблагоприятного события, связанного с лечением гиперпролиферативного заболевания иммуностимулирующим средством, предусматривающие введение субъекту антитела к TIGIT и субтерапевтической дозы антитела к PD-1. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект представляет собой человека. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к PD-1 представляет собой моноклональное антитело человеческой последовательности, а антитело к TIGIT представляет собой моноклональное антитело человеческой последовательности, такое как антитело, содержащее CDR или переменные области описанных в настоящем документе антител.

Согласно одному варианту осуществления только субъекты с опухолями, демонстрирующими высокую экспрессию PVR и/или нектин-2 и высокую экспрессию PD-L1, выбираются для комбинированного воздействия антителом к TIGIT по настоящему изобретению и антагонистом PD-1. Согласно другому варианту осуществления субъекты с опухолями, демонстрирующими высокую экспрессию PVR и/или нектин-2, но низкую экспрессию PD-L1, выбираются для монотерапии антителами к TIGIT по настоящему изобретению или комбинированной терапии с другим терапевтическим средством, отличным от антагониста PD-1.

Согласно другим вариантам осуществления в настоящем изобретении предусмотрена комбинированная терапия, в которой антитело к TIGIT по настоящему изобретению вводят после воздействия антагонистом PD-1/PD-L1. Согласно одному варианту осуществления антитело к TIGIT вводят только после того, как лечение антагонистом PD-1/PD-L1 потерпело неудачу и привело к неполному терапевтическому ответу или к повторному появлению опухоли или рецидива (называемому в настоящем документе "неблагоприятный исход PD-1"). Согласно дополнительному варианту осуществления опухоли при таких неблагоприятных исходах PD-1 подвергают скринингу на экспрессию PVR и/или нектин-2, и только те, которые характеризуются экспрессией высокого уровня, обрабатывают антителами к TIGIT.

Подходящие антагонисты PD-1 для использования в описанных в настоящем документе способах включают в себя, без ограничения, лиганды, антитела (например, моноклональные антитела и биспецифические антитела) и мультвалентные средства. Согласно одному варианту осуществления антагонист PD-1 представляет собой слитый белок, например слитый белок Fc, такой как AMP-244. Согласно одно-

му варианту осуществления антагонист PD-1 представляет собой антитело к PD-1 или к PD-L1.

Иллюстративное антитело к PD-1 представляет собой OPDIVO®/ниволумаб (BMS-936558) или антитело, которое содержит CDR или вариабельные области одного из антител 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 7D3, 5F4 и 4A11, описанных в публикации международной заявки WO 2006/121168. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к PD-1 представляет собой МК-3475 (KEYTRUDA®/пембролизумаб/ранее ламбролизумаб), описанный в публикации международной заявки WO 02012/145493; AMP-514/MEDI-0680, описанный в публикации международной заявки WO 2012/145493; и CT-011 (пидилизумаб, ранее CT-AcTibody или BAT, см., например, Rosenblatt et al. (2011) J. Immunotherapy 34:409). Другие известные PD-1-антитела и другие ингибиторы PD-1 включают в себя те, которые описаны в публикациях международных заявок WO 2009/014708, WO 03/099196, WO 2009/114335, WO 2011/066389, WO 2011/161699, WO 2012/145493, в патентах США № 7635757 и 8217149, а также в патентных публикациях США № 2009/0317368. Могут также использоваться любые антитела к PD-1, описанные в публикации международной заявки WO 201/173223. Антитело к PD-1, которое конкурирует за связывание и/или связывается с одним и тем же эпитопом на PD-1, также может быть использовано в комбинированных воздействиях как одно из этих антител.

В настоящем документе представлены способы лечения гиперпролиферативного заболевания (например, злокачественной опухоли), предусматривающие введение субъекту антагонистического антитела к TIGIT и антагонистического антитела к PD-L1. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к TIGIT вводят в субтерапевтической дозе, антитело к PD-L1 вводят в субтерапевтической дозе или оба вводят в субтерапевтической дозе. Предлагаемые в настоящем документе способы для изменения неблагоприятного события, связанного с лечением гиперпролиферативного заболевания иммуностимулирующим средством, предусматривают введение субъекту антитела к TIGIT и субтерапевтической дозы антитела к PD-L1. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект представляет собой человека. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к PD-L1 представляет собой моноклональное антитело человеческой последовательности, а антитело к TIGIT представляет собой моноклональное антитело человеческой последовательности, такое как антитело, содержащее CDR или вариабельные области раскрытых в настоящем документе антител.

Согласно одному варианту осуществления антитело к PD-L1 представляет собой BMS-936559 (обозначаемое как 12A4 в публикации международной заявки WO 2007/005874 и патенте США № 7943743), MSB0010718C (в публикации международной заявки WO-013/79174) или антитело, которое содержит CDR или вариабельные области 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 и 13G4, которые описаны в публикации PCT WO 07/005874 и в патенте США № 7943743. Согласно определенному варианту осуществления антитело к PD-L1 представляет собой MEDI4736 (также известный как анти-B7-H1) или MPDL3280A (также известный как RG7446). Могут также использоваться любые антитела к PD-L1, описанные в публикациях международных заявок WO 2000/173223, WO 02011/066389, WO2012/145493, патентах США № 7635757 и 8217149 и публикации США № 2009/145493. Антитела к PD-L1, которые конкурируют и/или связываются с тем же эпитопом, что и любое из этих антител, могут также использоваться в комбинированных способах лечения.

Согласно еще одному варианту осуществления агонистическое антитело к huCD40 по настоящему изобретению комбинируют с антагонистом передачи сигналов PD-1/PD-L1, таким как антагонист PD-1 или антагонист PD-L1, в сочетании с третьим иммунотерапевтическим средством. Согласно одному варианту осуществления третье иммунотерапевтическое средство представляет собой антагониста GITR или антагониста OX-40, такого как описанные в настоящем документе антитела к GITR или к OX40.

Согласно другому аспекту иммуно-онкологическое средство представляет собой агониста GITR, такого как агонистическое антитело GITR. Подходящие антитела GITR включают в себя, например, BMS-986153, BMS-986156, TRX-518 (публикации международных заявок WO 06/105021, WO 09/009116) и МК-4166 (публикация международной заявки WO 11/028683).

Согласно другому аспекту иммуно-онкологическое средство представляет собой антагониста IDO. Подходящие антагонисты IDO включают в себя, например, INCB-024360 (публикации международных заявок WO 2006/122150, WO 07/75598, WO 08/36653, WO 08/36642), индоксимод или NLG-919 (публикации международных заявок WO 09/73620, WO 09/1156652, WO 11/56652, WO 12/142237).

Предлагаемые в настоящем документе способы лечения гиперпролиферативного заболевания (например, злокачественной опухоли) предусматривают введение субъекту описанного в настоящем документе антитела к TIGIT и антагонистического антитела CTLA-4. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к TIGIT вводят в субтерапевтической дозе, антитело к CTLA-4 вводят в субтерапевтической дозе или оба вводят в субтерапевтической дозе. Предлагаемые в настоящем документе способы изменения нежелательного явления, связанного с лечением гиперпролиферативного заболевания иммуностимулирующим средством, предусматривают введение субъекту антитела к TIGIT и субтерапевтической дозы антитела к CTLA-4. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект представляет собой человека. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к CTLA-4 представляет собой антитело, выбранное из группы, состоящей из: YERVOY® (ипилилумаб или антитело 10D1, описанное в

публикации PCT WO 01/14424), тремелимуаб (ранее тицилимуаб, CP-675,206) и антитело к CTLA-4, описанное в следующих публикациях: публикациях международных заявок WO 98/42752; WO 00/37504; патенте США № 6207156; Hurwitz et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95(17): 10067-10071; Camacho et al. (2004) J. Clin. Oncology 22(145): Abstract № 2505 (антитело CP-675206) и Mokyr et al. (1998) Cancer Res. 58:5301-5304. Могут также использоваться любые антитела к CTLA-4, описанные в публикации международной заявки WO 023/173223.

В настоящем документе представлены способы лечения гиперпролиферативного заболевания (например, злокачественной опухоли), предусматривающие введение субъекту антитела к TIGIT и антитела к LAG-3. Согласно другим вариантам осуществления антитело к TIGIT вводят в субтерапевтической дозе, антитело к LAG-3 вводят в субтерапевтической дозе или оба вводят в субтерапевтической дозе. В настоящем документе представлены способы изменения неблагоприятного события, связанного с лечением гиперпролиферативного заболевания иммуностимулирующим средством, предусматривающие введение субъекту антитела к TIGIT и субтерапевтической дозы антитела к LAG-3. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к LAG-3 представляет собой моноклональное антитело человеческой последовательности, а антитело к TIGIT представляет собой моноклональное антитело человеческой последовательности, такое как антитело, содержащее CDR или переменные области описанных в настоящем документе антител. Примеры антител к LAG3 включают в себя антитела, содержащие CDR или переменные области антител 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 или 17E5, которые описаны в патентной публикации US 0101/0150892 и публикации международной заявки WO 2014/008218. Согласно одному варианту осуществления антитело к LAG-3 представляет собой BMS-986016. Другие признанные в настоящей области техники антитела к LAG-3, которые могут быть использованы, включают в себя IMP731, описанное в US 2011/007023. Также может применяться IMP-321. Антитела к LAG-3, которые конкурируют и/или связываются с тем же эпитопом, что и любое из этих антител, также могут использоваться в комбинированных способах лечения.

Введение описанных в настоящем документе антител к TIGIT и антагонистов, например антагонистических антител, к одному или нескольким антигенам-мишеням, таким как LAG-3 и/или CTLA-4, и/или PD-1, и/или PD-L1, может усиливать иммунный ответ на злокачественные клетки у пациента. Злокачественные опухоли, рост которых можно ингибировать с использованием антител согласно настоящему раскрытию, включают в себя злокачественные опухоли, как правило, реагирующие на иммунотерапию. Репрезентативные примеры злокачественных опухолей для лечения комбинированной терапией по настоящему раскрытию включают в себя те виды злокачественных опухолей, которые перечислены выше в обсуждении монотерапии антителами к TIGIT.

Согласно некоторым вариантам осуществления комбинация обсуждаемых в документе терапевтических антител может вводиться одновременно в виде одной композиции в фармацевтически приемлемом носителе или одновременно в виде отдельных композиций с каждым антителом в фармацевтически приемлемом носителе. Согласно другому варианту осуществления комбинацию терапевтических антител можно вводить последовательно. Например, антитело к CTLA-4 и антитело к TIGIT можно вводить последовательно, например первым вводить антитело к CTLA-4, а вторым антитело к TIGIT или первым вводить антитело к TIGIT, а вторым - антитело к CTLA-4. Дополнительно или альтернативно, антитело к PD-1 и антитело к TIGIT можно вводить последовательно, например первым вводить антитело к PD-1, а вторым - антитело к TIGIT или первым вводить антитело к TIGIT, а вторым - антитело к PD-1.

Дополнительно или альтернативно, антитело к PD-L1 и антитело к TIGIT можно вводить последовательно, например, первым вводить антитело к PD-L1, а вторым - антитело к TIGIT или первым вводить антитело к TIGIT, а вторым - антитело к PD-L1. Дополнительно или альтернативно, антитело к LAG-3 и антитело к TIGIT можно вводить последовательно, например, первым вводить антитело к LAG-3, а вторым - антитело к TIGIT или первым вводить антитело к TIGIT, а вторым - антитело к LAG-3.

Кроме того, если последовательно вводить более одной дозы комбинированной терапии, порядок последовательного введения может быть отменен или сохранен в том же виде в каждый момент времени введения, последовательные введения могут быть объединены с одновременными введениями или любой их комбинацией. Например, первое введение комбинации антитела к CTLA-4 и антитела к TIGIT может быть одновременным, второе введение может быть последовательным с введением антитела к CTLA-4 первым и введением антитела к TIGIT вторым, а третье введение может быть последовательным с введением антитела к TIGIT первым и введением антитела к CTLA-4 вторым и т.д. Дополнительно или альтернативно, первое введение комбинации антитела к PD-1 и антитела к TIGIT может быть одновременным, второе введение может быть последовательным с введением антитела к PD-1 первым и введением антитела к TIGIT вторым, а третье введение может быть последовательным с введением антитела к TIGIT первым и введением антитела к PD-1 вторым и т.д. Дополнительно или альтернативно, первое введение комбинации антитела к PD-L1 и антитела к TIGIT может быть одновременным, второе введение может быть последовательным с введением антитела к PD-L1 первым и введением антитела к TIGIT вторым, а третье введение может быть последовательным с введением антитела к TIGIT первым и антитела к PD-L1 вторым и т.д. Дополнительно или альтернативно, первое введение комбинации антител к

LAG-3 и антитела к TIGIT может быть одновременным, второе введение может быть последовательным с введением антитела к LAG-3 первым и антитела к TIGIT вторым, а третье введение может быть последовательным с введением антитела к TIGIT первым и антитела к LAG-3 вторым и т. д. Другая репрезентативная схема дозирования может предусматривать первое введение, которое является последовательным с введением антитела к TIGIT первым и антитела к CTLA-4 (и/или антитела к PD-1, и/или антитела к PD-L1, и/или антитела к LAG-3) вторым, а последующие введения могут быть одновременными.

Необязательно, анти-TIGIT как единственное иммунотерапевтическое средство или комбинация антитела к TIGIT и одного или нескольких дополнительных иммунотерапевтических антител (например, к CTLA-4, и/или к PD-1, и/или к PD-L1, и/или к LAG-3) могут быть дополнительно объединены с иммуногенным средством, таким как злокачественные клетки, очищенные опухолевые антигены (включая в себя рекомбинантные белки, пептиды и молекулы углеводов), клетки и клетки, трансфицированные с генами, кодирующими иммуностимулирующие цитокины (He et al. (2004) *J. Immunol.* 173:4919-28). Неограничивающие примеры опухолевых вакцин, которые могут быть использованы, включают в себя пептиды антигенов меланомы, такие как пептиды gp100, антигены MAGE, Trp-2, MART1 и/или тирозиназу, или опухолевые клетки, трансфицированные для экспрессии цитокина GM-CSF (обсуждается дополнительно ниже). Ингибитор TIGIT и одно или несколько дополнительных антител (например, блокада CTLA-4, и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3 блокада) также могут быть дополнительно объединены со стандартными способами лечения злокачественных опухолей. Например, ингибитор TIGIT и одно или несколько дополнительных антител (например, блокада CTLA-4, и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3) могут эффективно сочетаться с химиотерапевтическими схемами лечения. В этих случаях можно уменьшить дозу другого химиотерапевтического реагента, вводимого с комбинацией согласно настоящему раскрытию (Mokyr et al. (1998) *Cancer Research* 58: 5301-5304). Примером такой комбинации является комбинация агонистического антитела к TIGIT с дополнительным антителом или без него, таким как антитела к CTLA-4 и/или антитела к PD-1, и/или антитела к PD-L1, и/или антитела к LAG-3, дополнительно в комбинации с декарбазином для лечения меланомы. Другим примером является комбинация антитела к TIGIT с антителами к CTLA-4, и/или антителами к PD-1, и/или антителами к PD-L1, и/или антителами LAG-3 или без них, дополнительно в сочетании с интерлейкином-2 (IL-2) для лечения меланомы. Научное обоснование совместного применения ингибирования TIGIT и блокады CTLA-4 и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3 с химиотерапией заключается в том, что гибель клеток, которая является следствием цитотоксического действия большинства химиотерапевтических соединений, должна приводить к увеличению уровней опухолевого антигена в антигенпрезентирующем пути. Другие комбинированные терапии, которые могут приводить к синергии с комбинированным ингибированием TIGIT с блокадой CTLA-4, и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3 или без нее посредством гибели клеток, включают в себя радиацию, хирургию или выключение эндокринной функции. Каждый из этих протоколов создает источник опухолевого антигена в хозяине. Ингибиторы ангиогенеза также можно комбинировать с комбинированным ингибированием TIGIT и блокадой CTLA-4 и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3. Ингибирование ангиогенеза приводит к гибели опухолевых клеток, которые могут быть источником опухолевого антигена, подаваемого в антигенпрезентирующий путь хозяина.

Антагонистическое антитело к TIGIT в качестве единственного иммунотерапевтического средства или комбинация антагонистических антител TIGIT и CTLA-4, и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3 могут также использоваться в комбинации с биспецифическими антителами, которые нацеливают экспрессирующие рецепторы Fc α или Fc γ эффекторные клетки на опухолевые клетки (см., например, патенты США № 5922845 и 5837243). Биспецифические антитела можно использовать для нацеливания на два отдельных антигена. T-клеточное плечо этих ответов было бы дополнено применением комбинированного ингибирования TIGIT и блокады CTLA-4, и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3.

В другом примере антагонистическое антитело к TIGIT в качестве единственного иммунотерапевтического средства или комбинация антитела к TIGIT и дополнительного иммуностимулирующего средства, например антитела к CTLA-4, и/или антитела к PD-1, и/или антитела к PD-L1, и/или средства LAG-3, например, антитела, могут быть использованы в сочетании с противоопухолевым средством, таким как RITUXAN® (ритуксимаб), HERCEPTIN® (трастузумаб), BEXXAR® (тозитумомаб), ZEVALIN® (ибритумомаб), CAMPATH® (алемтузумаб), LYMPHOCIDE® (эпртузумаб), AVASTIN® (бевацизумаб) и TARCEVA® (эрлотиниб) и тому подобное. В качестве примера и не желая связывать себя теорией, лечение противоопухолевым антителом или конъюгированным с токсином противоопухолевым антителом может привести к гибели злокачественных клеток (например, опухолевых клеток), которые могли бы усилить иммунный ответ, опосредованный иммуностимулирующим средством, например средством TIGIT, CTLA-4, PD-1, PD-L1 или LAG-3, например антителом. Согласно иллюстративному варианту осуществления лечение гиперпролиферативного заболевания (например, злокачественной опухоли) может включать в себя противоопухолевое средство, например антитело, в комбинации с анти-TIGIT и необязательно дополнительное иммуностимулирующее средство, например анти-CTLA-4, и/или анти-PD-1, и/или анти-PD-L1, и/или анти-LAG-3 средство, например антитело, одновременно или последовательно, или любую их комбинацию, которые могут потенцировать иммунные ответы против опухолей у хозяина.

Опухоли уклоняются от иммунного надзора хозяина с помощью множества различных механизмов. Многие из этих механизмов могут быть преодолены путем инактивации белков, которые экспрессируются опухолями и которые представляют собой иммуносупрессивные. К ним относятся, в частности, TGF- β (Kehrl et al. (1986) *J. Exp. Med.* 163: 1037-1050), IL-10 (Howard & O'Garra (1992) *Immunology Today* 13: 198-200) и Fas-лиганд (Hahne et al. (1996) *Science* 274: 1363-1365). Антитела к каждому из этих объектов могут быть дополнительно объединены с антителом к TIGIT с дополнительным иммуностимулирующим средством или без него, например средством к CTLA-4, и/или к PD-1, и/или к PD-L1, и/или к LAG-3, таким как антитело, для противодействия действию иммуносупрессивных средств и благоприятного противоопухолевого иммунного ответа хозяином.

Другие средства, например антитела, которые могут быть использованы для активации иммунной реакции хозяина, могут быть дополнительно использованы в комбинации с антителом к TIGIT с дополнительным иммуностимулирующим средством или без него, таким как антитело к CTLA-4, и/или к PD-1, и/или к PD-L1, и/или к LAG-3. К ним относятся молекулы на поверхности дендритных клеток, которые активируют функцию DC и презентацию антигена. Антитела к CD40 (Ridge et al., выше) могут быть использованы в сочетании с антителом к TIGIT и необязательно дополнительным иммуностимулирующим средством, например, анти-CTLA-4, и/или анти-PD-1 и/или анти-PD-L1, и/или анти-LAG-3 средством, например антителом. Другие активирующие антитела к костимулирующим молекулам Т-клеток OX-40 (Weinberg et al. (2000) *Immunol.* 164:2160-2169), CD137/4-1BB (Melero et al. (1997) *Nature Medicine* 3:682-685 (1997) и ICOS (Hutloff et al. (1999) *Nature* 397:262-266) также могут обеспечивать повышенные уровни активации Т-клеток.

Как обсуждалось выше, трансплантация костного мозга в настоящее время используется для лечения различных опухолей гемопоэтического происхождения. Анти-TIGIT иммунотерапию самостоятельно или в сочетании с блокадой CTLA-4, и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3 можно применять для повышения эффективности трансплантированных от донора опухолеспецифических Т-клеток.

Несколько экспериментальных протоколов лечения включают в себя активацию *ex vivo* и увеличение количества антигенспецифических Т-клеток, и адоптивный перенос этих клеток реципиентам для антигенспецифических противоопухолевых Т-клеток (Greenberg & Riddell, выше). Эти способы также могут быть применены для активации ответов Т-клеток на инфекционные патогены, такие как ЦМВ. Можно ожидать, что активация *ex vivo* в присутствии анти-TIGIT с дополнительной иммуностимулирующей терапией или без нее, например антитела к CTLA-4, и/или антитела к PD-1, и/или антитела к PD-L1, и/или антитела к LAG-3, будет увеличивать частоту и активность адоптивно перенесенных Т-клеток.

В настоящем документе представлены способы для изменения неблагоприятного события, связанного с лечением гиперпролиферативного заболевания (например, злокачественной опухоли) иммуностимулирующим средством, предусматривающие введение антитела к TIGIT с субтерапевтической дозой анти-CTLA-4, и/или анти-PD-1, и/или анти-PD-L1, и/или анти-LAG-3 средства, например антитела, или без него субъекту. Например, описанные в настоящем документе способы предусматривают способ снижения частоты индуцированного иммуностимулирующим терапевтическим средством колита или диареи путем введения пациенту неабсорбируемого стероида. Используемый в настоящем документе термин "неабсорбируемый стероид" представляет собой глюкокортикоид, который проявляет обширный метаболизм первого прохода, так что после метаболизма в печени биодоступность стероида низка, т.е. менее приблизительно 20%. Согласно одному описанному в настоящем документе варианту осуществления неабсорбируемый стероид представляет собой будесонид. Будесонид является локально действующим глюкокортикостероидом, который интенсивно метаболизируется, главным образом, печенью после перорального введения. ENTOCORT EC® (Astra-Zeneca) представляет собой зависимый от pH и времени пероральный состав будесонида, разработанный для оптимизации доставки лекарств в подвздошную кишку и во всю толстую кишку. ENTOCORT EC® одобрен в США для лечения легкой и умеренной болезни Крона с вовлечением подвздошной кишки и/или восходящей ободочной кишки. Обычная пероральная доза ENTOCORT EC® для лечения болезни Крона составляет 6-9 мг/день. ENTOCORT EC® выделяется в кишечнике, прежде чем его абсорбируют и удержат в слизистой оболочке кишечника. Как только он проходит через ткань-мишень слизистой оболочки кишечника, ENTOCORT EC® интенсивно метаболизируется системой цитохрома P450 в печени до метаболитов с незначительной глюкокортикоидной активностью. Таким образом, биодоступность является низкой (приблизительно 10%). Низкая биодоступность будесонида приводит к улучшению терапевтического соотношения по сравнению с другими глюкокортикоидами с менее интенсивным метаболизмом первого прохода. Будесонид приводит к меньшему количеству побочных эффектов, в том числе к меньшей гипоталамо-гипофизарной супрессии, чем системно действующие кортикостероиды. Тем не менее, хроническое введение ENTOCORT EC® может приводить к системным глюкокортикоидным эффектам, таким как гиперкортицизм и супрессия надпочечников. См. PDR 58th ed. 2004; 608-610.

Согласно еще одному варианту осуществления ингибирование TIGIT с блокадой CTLA-4, и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3 (т.е. иммуностимулирующие терапевтические антитела к TIGIT и, необязательно, антитела к CTLA-4, и/или к PD-1, и/или к PD-L1, и/или к LAG-3) или без них в сочетании с

неабсорбируемым стероидом могут быть дополнительно объединены с салицилатом. Салицилаты включают в себя средства 5-ASA, такие как, например, сульфасалазин (AZULFIDINE®, Pharmacia & UpJohn); олсалазин (DIPENTUM®, Pharmacia & Up John); бальсалазид (COLAZAL®, Salix Pharmaceuticals, Inc.) и мезаламин (ASACOL®, Procter & Gamble Pharmaceuticals, PENTASA®, Shire US, CANASA®, Axcan Scandipharm, Inc, ROWASA®, Solvay).

В соответствии с описанными в настоящем документе способами салицилат, вводимый в комбинации с анти-TIGIT с антителами к CTLA-4, и/или к PD-1, и/или к PD-L1, и/или LAG-3 или без них, и неабсорбируемый стероид могут включать в себя любое перекрывающееся или последовательное введение салицилата и неабсорбируемого стероида с целью снижения частоты возникновения колита, вызванного иммуностимулирующими антителами. Так, например, способы снижения частоты колита, вызванного иммуностимулирующими антителами, описанными в настоящем документе, охватывают одновременное или последовательное введение салицилата и неабсорбируемого стероида (например, салицилат вводят через 6 часов после неабсорбируемого стероида) или любой их комбинации. Кроме того, салицилат и неабсорбируемый стероид можно вводить одним и тем же путем (например, оба вводят перорально) или различными путями (например, салицилат вводят перорально, а неабсорбируемый стероид вводят ректально), которые могут отличаться от пути(ей), используемого для введения антител к TIGIT и к CTLA-4, и/или к PD-1, и/или к PD-L1, и/или к LAG-3.

Описанные в настоящем документе антитела к TIGIT и терапии с комбинированными антителами могут также использоваться в сочетании с другими хорошо известными способами лечения, которые выбраны для их конкретного применения против подвергаемого лечению показания (например, злокачественной опухоли). Комбинации описанных в настоящем документе антител к TIGIT могут быть использованы последовательно с известным фармацевтически приемлемым средством(ами).

Например, описанные в настоящем документе антитела к TIGIT и терапии с комбинированными антителами могут быть использованы в комбинации (например, одновременно или отдельно) с дополнительным воздействием, таким как облучение, химиотерапия (например, с использованием камптотецина (CPT-11), 5-фторурацила (5-FU), цисплатина, доксорубицина, иринотекана, паклитаксела, гемцитабина, цисплатина, паклитаксела, карбоплатин-паклитаксела (таксола), доксорубицина, 5-fu или камптотецина + аро21/TRAIL (6X combo)), одним или несколькими ингибиторами протеасом (например, бортезомиб или MG132), одним или несколькими ингибиторами Bcl-2 (например, антагонистами BH3I-2' (ингибитор bcl-xl), ингибиторами индоламинадиоксигеназы-1 (IDO1) (например, INCB24360), AT-101 (R(-)-производное госсипола), АВТ-263 (малая молекула), GX-15-070 (обатоклак) или MCL-1 (белок-1 дифференцировки клеток миелоидного лейкоза)), антагонистами iAP (ингибитор белка апоптоза) (например, smac7, smac4, низкомолекулярный миметик smac, синтетические smac-пептиды (см. Fulda et al., Nat. Med. 2002; 8:808-15), ISIS23722 (LY2181308) или AEG-35156 (GEM-640)), ингибиторами HDAC (гистондеацетилазы), антителами к CD20 (например, ритуксимаб), ингибиторами ангиогенеза (например, бевацизумаб), антиангиогенными средствами, нацеленными на VEGF и VEGFR (например, AVASTIN®), синтетическими тритерпеноидами (см. Huer et al., Cancer Research 2005;65:4799-808), модуляторами c-FLIP (клеточный ингибирующий FLICE белок) (например, природные и синтетические лиганды PPAR γ (активированный пролифератором пероксисом рецептор γ), 5809354 или 5569100), ингибиторами киназы (например, сорафениб), трастузумаб, цетуксимаб, темсиролимус, такими ингибиторами mTOR, как рапамицин и темсиролимус, бортезомиб, ингибиторами JAK2, ингибиторами HSP90, ингибиторами PI3K-AKT, ингибиторами леналилдомида, ингибиторами GSK3 β , ингибиторами IAP и/или генотоксическими лекарственными средствами.

Описанные в настоящем документе антитела к TIGIT и терапии с комбинированными антителами могут дополнительно использоваться в комбинации с одним или несколькими антипролиферативными цитотоксическими средствами. Классы соединений, которые могут быть использованы в качестве антипролиферативных цитотоксических средств, включают в себя, без ограничения, следующие.

Алкилирующие средства (включающие в себя, без ограничения, азотистый иприт, производные этиленимина, алкилсульфонаты, нитрозомочевины и триазены): урациловый иприт, хлорметин, циклофосфамид (CYTOXAN™) фосфамид, мелфалан, хлорамбуцил, пипроброман, триэтиленмеламин, триэтилендиофосфорамин, бусульфан, кармустин, ломустин, стрептозоцин, дакарбазин и темозоломид.

Антиметаболиты (включающие в себя, без ограничения, антагонисты фолиевой кислоты, аналоги пиримидина, аналоги пурина и ингибиторы аденозиндезаминазы): метотрексат, 5-фторурацил, флукурин, цитарабин, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, флударабинфосфат, пентостатин и гемцитабин.

Подходящие антипролиферативные средства для комбинирования с антагонистическими антителами к TIGIT, без ограничения, таксаны, паклитаксел (паклитаксел коммерчески доступен в виде TAXOL™), доцетаксел, дискодермолид (DDM), диктиостатин (DCT), пеларузид А, эпотилоны, эпотилон А, эпотилон В, эпотилон С, эпотилон D, эпотилон Е, эпотилон F, фураноэпотилон D, дезоксиэпотилон В1, [17]-дегидродезоксипотилон В, [18]дегидродезоксипотилоны В, C12,13-циклопропилэпотилон А, C₆-C₈ соединенный мостиковой связью эпотилон А, транс-9,10-дегидроэпотилон D, цис-9,10-дегидроэпотилон D, 16-десметилэпотилон В, эпотилон В10, дисдеромолид, патупилон (ЕРО-906),

KOS-862, KOS-1584, ZK-EPO, ABJ-789, ХАА296А (дискoderмолид), TZT-1027 (соблидотин), ILX-651 (тасидотин гидрохлорид), халихондрин В, эрибулин мезилат (E-7389), хемиастерлин (НТI-286), E-7974, цирптофицины, LY-355703, иммуноконъюгаты майтанзиноидов (DM-1), МКС-1, АВТ-751, Т1-38067, Т-900607, SB-715992 (испинесиб), SB-743921, МК-0731, СТА-5312, элеутеробин, 17-β-ацетокси-2-этокси-6-оксо-В-гомоэстра-1,3,5(10)-триен-3-ол, циклострепгин, изолаулималид, лаулималид, 4-эпи-7-дегидрокси-14,16-диэтил-(+)-дискoderмолиды и криптотилон 1, в дополнение к другим стабилизирующим микротрубочки средствам, известным в настоящей области техники.

В случаях, когда желательнее представить аберрантно пролиферативные клетки одновременно или перед воздействием описанными в настоящем документе антителами к TIGIT, также пациенту могут вводиться гормоны и стероиды (включая в себя синтетические аналоги), такие как 17α-этинилэстрадиол, диэтилстильбэстрол, тестостерон, преднизон, флуоксиместерон, дромостанолон пропионат, тестолактон, мегестролацетат, метилпреднизолон, метилстеростерон, преднизолон, триамцинолон, хлортрианизен, гидроксипрогестерон, аминоклотетимид, эстрамустин, медроксипрогестеронацетат, лейпролид, флутамид, торемифен, ZOLADEX™. При использовании описанных в настоящем документе способов или композиций другие средства, используемые при модуляции роста опухоли или метастазирования в клинических условиях, такие как антимицетики, также могут быть введены по желанию.

Специалистам в настоящей области техники известны способы безопасного и эффективного введения химиотерапевтических средств. Кроме того, их введение описано в стандартной литературе. Например, введение многих химиотерапевтических средств описано в Настольном справочнике врачей (PDR), например издании 1996 года (Medical Economics Company, Montvale, N.J. 07645-1742, США); раскрытие которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

Химиотерапевтическое средство(а) и/или лучевая терапия могут применяться в соответствии с терапевтическими протоколами, хорошо известными в настоящей области техники. Специалистам в настоящей области техники будет очевидно, что введение химиотерапевтического средства(средств) и/или применение лучевой терапии может варьировать в зависимости от подвергаемого лечению заболевания и известных эффектов химиотерапевтического средства(средств) и/или лучевой терапии на это заболевание. Кроме того, согласно знаниям квалифицированного врача, терапевтические протоколы (например, количество дозировок и время введения) могут варьировать в зависимости от наблюдаемых эффектов вводимых терапевтических средств на пациента и с учетом наблюдаемых ответов заболевания на вводимые терапевтические средства.

Отбор пациентов.

Согласно различным вариантам осуществления настоящего изобретения пациентов подвергают исследованию перед лечением антителами к TIGIT по настоящему изобретению, чтобы определить, будут ли они реагировать на анти-TIGIT терапию, и только тех, которые проявляют признаки, связанные с терапевтическим ответом, подвергают лечению. Можно измерить экспрессию белков, связанных с путем TIGIT, включая в себя TIGIT, DNAM, PVR, нектин-2, растворимый PVR (sPVR) и растворимый нектин-2 (sNectin-2) или их комбинации. mPNC PVR и нектин-2 высоко экспрессируются в большинстве опухолей человека. См. пример 9 и фиг. 6А. Согласно одному варианту осуществления sPVR и/или sNectin-2 обнаруживаются в человеческой сыворотке, например, с помощью ИФА, где повышенное содержание sPVR и/или sNectin-2 указывает на субъектов со злокачественной опухолью, которые вероятно будут реагировать на лечение антителами к TIGIT по настоящему изобретению.

Согласно некоторым вариантам осуществления образцы от пациентов подвергают скринингу на экспрессию DNAM-1 на Т-клетках, чтобы выбрать пациентов, которые наиболее вероятно будут отвечать на анти-TIGIT терапию, причем присутствие DNAM-1 на Т-клетках или НК-клетках предполагает, что пациент будет характеризоваться благоприятным противоопухолевым ответом на анти-TIGIT терапию, например лечение антителом или фрагментом к huTIGIT по настоящему изобретению, а также отсутствие DNAM-1 на Т-клетках или НК-клетках идентифицирует пациентов, которые с меньшей вероятностью получают пользу от терапии против TIGIT. Согласно другим вариантам осуществления образцы от пациентов подвергают скринингу на экспрессию PVR и/или нектин-2/CB112 на опухолевых клетки или инфильтрующих в опухоль миелоидных клетках для отбора пациентов, которые наиболее вероятно будут отвечать на анти-TIGIT терапию, причем присутствие PVR и/или нектин-2/CD112 на опухолевых клетках или инфильтрующих в опухоль миелоидных клетках предполагает, что у пациента будет благоприятный противоопухолевый ответ при анти-TIGIT терапии, например лечении средством или фрагментом к huTIGIT по настоящему изобретению, а также отсутствие PVR и/или нектин-2/CD112 на опухолевых клетках или инфильтрующих в опухоль миелоидных клетках идентифицирует пациентов, которые с меньшей вероятностью получают пользу от анти-TIGIT терапии.

Согласно одному варианту осуществления содержание растворимого PVR и/или нектин-2 измеряется у субъектов, рассматриваемых для лечения антителами к TIGIT по настоящему изобретению, и только субъекты, проявляющие повышенное содержание растворимого PVR и/или нектин-2 подвергаются лечению антителами. Например, высокорастворимый PVR и/или нектин-2 можно использовать в качестве биомаркера выбора пациента.

Типы опухолей и опухоли у отдельных субъектов наиболее вероятно будут отвечать на лечение антителами к TIGIT по настоящему изобретению, если опухолевые клетки экспрессируют повышенные уровни PVR и/или нектин-2, а также, если такие опухоли характеризуются высоким уровнем инфильтрации TIGIT⁺ CD8⁺ Т-клеток.

Настоящее раскрытие дополнительно иллюстрируется следующими примерами, которые не должны толковаться как дополнительное ограничение. Содержание всех фигур и всех ссылок, последовательностей Genbank, патентов и опубликованных заявок на патенты, приведенных во всей настоящей заявке, явным образом включено в настоящий документ посредством ссылки. В частности, раскрытия публикаций PCT WO 09/045957, WO 09/073533, WO 09/073546, WO 09/054863 и PCT/US2013/072918 и патентной публикации США № 2011/0150892 явным образом включены в настоящий документ посредством ссылки.

Примеры

Пример 1. Получение антител к huTIGIT.

Моноклональные антитела к huTIGIT человека получали с использованием трансгенных мышей, которые экспрессируют гены человеческого антитела, как показано ниже.

Антиген.

В качестве антигена для иммунизации использовали растворимый рекомбинантный белок huTIGIT. Растворимый слитый белок характеризуется молекулярной массой 40,7 кДа и состоит из внеклеточной части huTIGIT, связанной с Fc IgG2a мыши на своем С-конце. Этот слитый белок упоминается в настоящем документе как "слитый белок huTIGIT-muFc". Слитый белок получают стандартными способами рекомбинантной ДНК и экспрессируют в трансфицированных клетках CHO, которые секретируют растворимый слитый белок в супернатант культуры. Клетки-хозяева CHO, используемые для трансфекции, получали из Invitrogen (№ в каталоге 11619-012). Секретируемый растворимый слитый белок очищали для использования в качестве иммуногена. Последовательность полноразмерного человеческого TIGIT, включающая в себя сигнальную последовательность, представлена в SEQ ID NO: 1.

Трансгенные мыши.

Полностью человеческие моноклональные антитела к человеческому TIGIT получали с использованием мышей из генотипа CHD**, CKD2**, CMD++, JKD++, KCo5 (9272)+[^], SC20+ (далее называемые мышами KM®). В круглых скобках указаны индивидуальные обозначения трансгенов, за которыми следуют номера для случайно интегрированных трансгенов. Символы ++ и + указывают на гомозиготную или гемизиготную форму; однако, поскольку мышам, как правило, подвергают скринингу с использованием ПЦР-анализа, который не позволяет различать гетерозиготность и гомозиготность для случайно интегрированных трансгенов Ig человека, обозначение + может быть дано мышам, которые на самом деле гомозиготны по этим элементам. В этой линии эндогенный ген легкой цепи к гомозиготно разрушали, как описано в Chen et al. (1993) EMBO J. 12:811-820, и эндогенный ген тяжелой цепи мыши гомозиготно разрушали, как описано в примере 1 публикации международной заявки WO 2001/09187. Кроме того, эта линия мыши переносит трансген легкой цепи к человека, KCo5, как описано в Fishwild et al. (1996) Nature Biotechnology 14:845-851, искусственную хромосому дрожжей (YAC), несущую большую часть локуса легкой цепи человека к, как описано в публикации международной заявки WO 2000/026373.

Иммунизация мышам.

Для получения полностью человеческих моноклональных антител к человеческому TIGIT мышам KM иммунизировали очищенным слитым белком huTIGIT-muFc. Общие схемы иммунизации описаны в Lonberg, N. et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859; Fishwild D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851 и публикации международной заявки WO 98/24884. Мышам было приблизительно 4 месяца после первой инфузии антигена. Для иммунизации мышам внутрибрюшинно и подкожно использовали либо очищенный рекомбинантный препарат антигена huTIGIT-muFc (10 мкг очищенного от трансфицированных клеток млекопитающих, экспрессирующих слитый белок), либо клетки 300-19, трансфицированные с человеческим TIGIT. Иммуногены смешивали 1:1с адьювантом RIBI (Sigma, номер в каталоге M6536).

Мышей иммунизировали 5 раз с интервалом 5-7 дней. Первую и вторую иммунизацию проводили рекомбинантным белком. Третью иммунизацию проводили клетками, 4-ю иммунизацию - белком и 5-ю иммунизацию - клетками. Через неделю после последних иммунизации у мышам брали кровь, чтобы оценить антигенспецифические титры. Иммунный ответ контролировали посредством ретроорбитальных кровотоков. Плазму подвергали скринингу с помощью анализа FACS с использованием трансфицированных клеток 300-19, и для слияний использовали мышам с самыми высокими титрами человеческого IgG к человеческому TIGIT. Мыши получили окончательную иммунизацию путем внутривенной (IV) и внутрибрюшинной (IP) инъекции растворимого антигена за 2 дня и трансфицированных клеток за 3 дня до умерщвления и удаления селезенки.

Получение гибридом, производящих человеческие моноклональные антитела к человеческому TIGIT.

Спленоциты мышам, выделенные из мышам с высоким титром KM, и партнера по слиянию миеломы мышам сливали электрослиянием на основе электрического поля с использованием электропоратора для слияния клеток с большой камерой Cyto Pulse (Cyto Pulse Sciences, Inc., Glen Burnie, MD). Одноцепо-

чечные суспензии селезеночных лимфоцитов от иммунизированных мышей сливали с равным числом несекретирующих клеток миеломы мыши P3X63 Ag8.6.53 (ATCC CRL 1580) (номер слияния: 2541). Полученные клетки высевали в количестве $2,0 \times 10^4$ клеток/лунку в планшеты с плоским дном для микротитрования в селективной среде DMEM с высоким содержанием глюкозы (Cellgro # 10-013-CM) и 10% фетальной телячьей сывороткой (Hyclone # SH30071.03) и дополняли β -меркаптоэтанолом (1000X, Gibco # 21985-023), 7 мМ HEPES (Cellgro 25-060-C1), дополнительным L-глутамином в концентрации 2 мМ (Cellgro 25-005-C1), НАТ (50X, Sigma # H-0262), 5% фактором клонирования гибридом (BioVeris # 210001), 10% P388DI (ATCC #CRL TIB-63) кондиционированной средой и пенициллин-стрептомицином (100x, Cellgro # 30-002-CI). Приблизительно через 7 дней часть среды, содержащей НАТ, заменяли средой, содержащей НТ (Cellgro # 25-047-CI).

Через 10-12 дней отдельные лунки подвергали скринингу на присутствие антител с легкими цепями к человеку/IgG человека с использованием анализа гомогенного HTRF. В этом анализе супернатанты из 96-луночных планшетов для слияния смешивали с меченым криптоном европия козьим античеловеческим IgG (специфическим фрагментом Fc), биотинилированной козьей античеловеческой легкой цепью к (Bethyl # A80-115B), стрептавидином-XLent и инкубировали в течение 1 ч. Затем планшеты прочитывали на ридере RUBYstar.

Клетки гибридомы из лунок, положительных на человеческую легкую цепь к или антитела человеческих IgG/человеческих легких цепей λ , затем подвергали скринингу с помощью FACS с использованием клеток 300-19, трансфицированных человеческими TIGIT и нетрансфицированных клеток 300-19 в качестве контроля. Позитивные по FACS исходные линии переносили в 24-луночные планшеты. Через несколько дней клеточные супернатанты из отдельных лунок повторно подвергали скринингу на FACS для подтверждения специфичности IgG к человеческому TIGIT.

Гибридомы клонировали путем серийного разведения и повторного скрининга с помощью FACS. Для увеличения количества и очистки выбирали тридцать шесть антител. Затем выбирали четыре антитела (15A6, 22G2, 11G11, 10D7) для секвенирования и дальнейшего анализа.

Пример 2. Связывание антител к huTIGIT с растворимым человеческим TIGIT.

Связывание антител к huTIGIT с растворимым человеческим TIGIT определяли посредством анализа поверхностного плазмонного резонанса (SPR) BIACORE®. Антитела к huTIGIT захватывали на покрытых человеческими к чипах (~ 5KRU, Southernbiotech, номер в каталоге 2060-01), и рекомбинантный человеческий TIGIT (rhTIGIT/Fc) пропускали через чип в концентрациях 500, 250, 125, 62 и 31 нМ. Концентрация захвата моноклонального антитела в объеме составляла 2-40 мкг/мл (5 мкл при 10 мкл/мин). Время связывания антигена составляло 5 мин при 15 мкл/мин, время диссоциации антигена составляло 6 мин, а регенерацию проводили с 50 мМ HCl/50 мМ NaOH (по 12 мкл каждого при 100 мкл/мин). Результаты показаны в табл. 3.

Таблица 3. Связывание моноклонального антитела к huTIGIT с человеческим TIGIT

Антитело	k_a ($M^{-1}s^{-1}$) ($\times 10^5$)	k_d (s^{-1}) ($\times 10^{-3}$)	K_D (нМ)
22G2	23,7	0,403	0,17
24E8	2,19	0,704	3,22
10B8	4,19	4,27	10,2
26F7	1,11	1,30	11,8
13D1	1,12	1,44	12,8
19H2	1,66	2,42	14,6
15A6	2,02	4,04	19,9
16F6	1,38	3,75	27,2
11G11	0,503	1,44	28,7
25E7	1,33	4,00	30,1
24G1	1,25	4,37	35,0
10D7	1,71	6,51	38,1
17G4	2,19	8,42	38,4
4E4	7,35	37,3	50,7
5F4	0,561	3,14	56,0
20G6	3,18	18,3	57,6
6F9	4,68	31,9	68,2
6F9	2,99	20,6	69,0
11C9	0,4	2,94	73,5
9B11	1,23	11,7	94,9
27F1	0,777	8,56	110
13E6	2,03	22,5	111
27F1	0,544	8,38	154
11G2	1,74	33,4	192
10C9	1,52	29,4	194
8C8	0,582	33,1	568

Связывание антител 14B2, 19H2 и 26D8 было слишком слабым для надежного измерения.

Предварительное определение константы связывания, показанное в табл. 3, использовали для выбора антител к huTIGIT для дальнейшего изучения. Затем определяли константы связывания субклонированных и очищенных антител 15A6 и 22G2 с использованием полных кривых титрования до 1,5 нМ и 90 пМ соответственно.

Проводили дополнительные эксперименты SPR, сравнивающие антитела 15A6 и 22G2, содержащие модифицированные каркасные остатки и измененные константные области IgG1 человека. Последовательность IgG1f человека представлена в SEQ ID NO: 45 с аллотипическим вариантом, представленным в SEQ ID NO: 46 (который отличается от SEQ ID NO: 45 в R97K, E239D и M241L). Человеческий IgG1.3 представлен в SEQ ID NO: 47 (который отличается от SEQ ID NO: 45 в L117A, L118E и G120A, которые соответствуют L234A, L235E и G237A при нумерации EU). Другая лишняя эффекторной функции константная область IgG1 человека, IgG1.1f человека, представлена в SEQ ID NO: 48 (которая отличается от SEQ ID NO: 45 в L117A, L118E, G120A, A213S и P214S, которые соответствуют L234A, L235E, G237A, A330S и P331S при нумерации EU). На фиг. 7 показано резкое снижение связывания рецептора Fc γ в конструкциях IgG1.1f. Использование таких "инертных" областей Fc может быть целесообразным, поскольку TIGIT высоко экспрессируется на CD8⁺ TIL, а антитела к TIGIT, характеризующиеся наличием эффекторной функции, могут истощать противоопухолевые CD8⁺ TIL и/или NK-клетки, необходимые для уничтожения опухоли.

Эксперименты SPR, сравнивающие 15A6 с каркасными вариантами A72S и/или N112T и антитело 22G2 с каркасным вариантом H3Q с их немодифицированными формами, показали, что ни изменение каркаса, ни изотипа значимо не влияло на связывание с человеческим TIGIT. Результаты приведены в табл. 4.

Таблица 4. Связывание выбранных моноклональных антител к huTIGIT с человеческим TIGIT

Антитело	Вариант последовательности	Изотип	k_a (M ⁻¹ s ⁻¹) (x10 ⁶)	k_d (s ⁻¹) (x10 ⁻³)	K_D (нМ)
15A6	-	IgG1f	1,0	1,5	1,5
15A6	-	IgG1.1f	1,1	1,6	1,5
15A6	A72S	IgG1.1f	1,1	1,7	1,5
15A6	N112T	IgG1.1f	1,1	1,9	1,7
15A6	A72S & N112T	IgG1.1f	1,0	2,0	2,0
22G2	-	IgG1f	1,9	0,17	0,09
22G2	-	IgG1.1f	2,0	0,13	0,07
22G2	H3Q	IgG1	1,9	0,30	0,16
22G2	H3Q	IgG1.1f	2,0	0,16	0,08

Дополнительные эксперименты SPR показали, что моноклональное антитело 22G2 связывается с человеческим TIGIT с K_D 0,06 нМ и с TIGIT яванского макака с K_D 0,09 нМ.

Нумерация аминокислотных остатков в перечне последовательностей 117 меньше, чем нумерация в литературе из-за использования нумерации EU и отсутствия варибельного домена в последовательностях IgG в перечне последовательностей. С-концевой остаток лизина (K), присутствующий в генетических конструкциях человеческих антител, часто отсутствует у коммерчески производимых антител, таких как терапевтические антитела по настоящему изобретению. Dick et al. (2008) Biotechnol. Bioeng. 100:1132. Соответственно, этот лизин не включен ни в одну из SEQ ID NO: 45-48, но согласно одному варианту осуществления антитело к huTIGIT по настоящему изобретению содержит этот дополнительный остаток лизина на С-конце тяжелой цепи(ей). Согласно некоторым вариантам осуществления антитела по настоящему изобретению находятся в препаратах, содержащих смесь тяжелых цепей с С-концевым лизином и тяжелых цепей без С-концевого лизина, например, в результате непреднамеренного отсечения на С-конце. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело к huTIGIT по настоящему изобретению содержит одну или несколько тяжелых цепей и одну или несколько легких цепей, таких как две тяжелые цепи и две легкие цепи.

Пример 3. Антитела к TIGIT, отсортированные на несколько групп.

Проводили эксперименты по сортированию антител на группы, чтобы определить, какие антитела к человеческому TIGIT конкурируют с другими за связывания с huTIGIT, и, таким образом, связываются с подобными эпитопами. Изучали антитела 14B2, 13E6, 6F9, 11G11, 10C9, 16F6, 11C9, 27A9, 10D7, 20G6, 24E8, 24G1, 27F1, 15A6, 4E4, 13D1, 9B11, 10B8, 22G2, 19H2, 8C8, 17G4, 25E7, 26D8 и 16A8.

Попарную конкуренцию между антителами к huTIGIT определяли следующим образом, когда первое антитело связано с поверхностью сенсорного чипа, второе антитело предварительно инкубируют с полипептидной конструкцией TIGIT в смеси, а предварительно инкубированную смесь пропускают через сенсорный чип, чтобы определить степень, в которой второе антитело препятствует связыванию полипептидной конструкции TIGIT с первым антителом на поверхности чипа. Вкратце, первые антитела к huTIGIT иммобилизовали на поверхностях чипа Sensor Chip CM5 (серии S, GE Healthcare, номер в каталоге BR-1005-30), flowcell2, flowcell3 и flowcell4 (5000 RU), в качестве отрицательного контроля использовали flowcell1. Вторичные антитела разводили до 120 мкг/мл (2-кратно) в начальной концентрации. Серии разведений вторичных антител получали путем разбавления концентрации антитела 1:3 буфером

для семи различных концентраций и контрольного образца с (0,0 мкг/мл) для получения кривой титрования. Каждую серию концентраций антител разделяли на две половины. В первой половине серий концентраций добавляли 40 нМ (2X) антигена TIGIT (rhTIGIT/Fc) для получения конечных серий концентраций (60 мкг/мл-0,0 мкг/мл) и 20 нМ конечной концентрации антигена в каждой лунке. Во второй половине серий концентраций вместо антигена добавляли буфер, чтобы антитело разбавить до той же концентрации, и эту половину обрабатывали как холостые пробы. Комплексы вторичных антител к TIGIT и rhTIGIT/Fc инкубировали в течение 2 ч. 40 мкл комплексов вносили на покрытую антителами (первичными) поверхность при скорости потока 30 мкл/мин. Использовали прибор для поверхностного плазменного резонанса BIACORE® T200, а в качестве подвижного буфера был HBE-EP, GE Healthcare, номер в каталоге BR-1001-88, отфильтрованный дегазированный, 0,01M HEPES, pH 7,4, 0,15 NaCl, 3 mM ЭДТА, 0,005% сурфактант P20. Поверхность регенерировали посредством 25 mM NaOH (код заказа: BR-1003-58, GE Healthcare) со скоростью 100 мкл/мин в течение 5 с. Данные анализировали с использованием Microsoft Excel, где серию концентраций вторичных антител наносили на график относительно соответствующего блока ответа для получения кривых титрования.

Результаты показывают, что исследуемые антитела разделяются на четыре группы. См. фиг. 1. Антитела в группе 1 (14B2, 13E6, 6F9, 11G11, 10C9, 16F6, 11C9, 27A9, 10D7, 20G6, 24E8, 24G1, 27F1, 15A6, 4E4, 13D1, 9B11, 10B8) блокируют связывание других антител внутри группы 1, а также 22G2, 19H2, 8C8 и 17G4. Антитела в группе 2 (25E7, 26D8, 16A8) блокируют связывание других антител внутри группы 2, а также 22G2, 19H2 и 8C8. Антитела 22G2, 19H2 и 8C8 (группа 3) блокируют связывание других антител в группе 3, а также антитела как в группе 1, так и в группе 2, но не 17G4 (группа 4). Антитело 17G4 блокирует связывание антител в группе 1, но не с другими антителами.

Пример 4. Картирование эпитопов посредством дрожжевого дисплея.

Эпитопы для выбранных антител к huTIGIT по настоящему изобретению (клоны 22G2, 11G11 и 15A6) определяли путем отображения случайно мутагенизированных вариантов внеклеточной области huTIGIT на дрожжах и сортировки этих дрожжей на основе их неспособности связываться с определенными антителами. Выбранные дрожжевые клетки, которые не связывались, амплифицировали и подвергали дополнительным раундам отбора в зависимости от их неспособности связываться с конкретными антителами по настоящему изобретению. См., например, Chao et al. (2004) *J. Mol. Biol.* 342:539. Последовательности для вариантов huTIGIT определяли для полученных в результате дрожжей и анализировали на эффект каждого остатка на связывание антител. Связывающий эпитоп для антител по настоящему изобретению определяли как локусы в последовательности huTIGIT, где одиночные аминокислотные мутации нарушали связывание с антителами к huTIGIT по настоящему изобретению.

Вкратце, ПЦР сниженной точности использовали для клонирования кодирующей TIGIT человека ДНК в конструкции, позволяющие экспрессию вариантов huTIGIT в качестве аминоконцевых частей слитых белков, кроме того, содержащую последовательность тегов с-тус и белок клеточной стенки дрожжей Ag α 1p. Такие конструкции, экспрессированные в дрожжах (*Saccharomyces cerevisiae*), отображают варианты полипептиды huTIGIT на поверхности дрожжевых клеток, прикрепленные к клеточной поверхности полипептидом Ag α 1p. Тег с-тус может быть необязательно использован в качестве положительного контроля для отображения huTIGIT-слитых белков на данной дрожжевой клетке. Дрожжевые клетки сортировали с помощью FACS, а те, которые экспрессировались как правильно сложенные huTIGIT-слитые белки (как определено связыванием контрольного мышиного антитела к huTIGIT, обнаруженного с помощью меченого аллокоцианином (APC) вторичного козьего антитела к мышиному IgG), но не связывались с антителами по настоящему изобретению (как определено путем обнаружения с меченым фикоэритрином (PE) козым античеловеческим IgG в качестве вторичного), объединяли, амплифицировали и использовали в последующих раундах отбора. Последовательность huTIGIT определяли для конструкций из дрожжей, оставшихся после нескольких раундов отбора. Контрольные эксперименты без выбора антител к huTIGIT подтвердили хорошее мутантное покрытие в каждом положении вдоль последовательности huTIGIT и обеспечили исходный уровень для нормирования результатов, полученных с выбранными библиотеками.

Выполняли миллионы высококачественных прочтений последовательностей для каждого антитела выбранной популяции мутантных молекул huTIGIT. Было обнаружено, что остаток 60 является структурно толерантным к мутации, но мутанты в этом положении не связываются с антителом 22G2, что указывает на то, что E60 участвует в эпитопе. Аналогично, остатки 1109, L65, N70, F107, T117, 168, H76 и N58 также были признаны важными остатками в эпитопе для антитела 22G2. Остатки эпитопа 22G2 группировались в первичные участки последовательности, содержащие остатки 58-76 (NWEQQDQL-LAICNADLGWH, SEQ ID NO: 38) и остатки 107-117 (FCIYHTYDPDGT; SEQ ID NO: 39). См. фиг. 2A. Этот эпитоп перекрывается с интерфейсом связывания TIGIT/PVR, как определено посредством рентгеновской кристаллической структуры. Stengel et al. (2012) *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)* 109:5399.

Аналогичные эксперименты с антителом 11G11 показали важные контактные точки в остатках G74, N70, H76, L65, L73, Q56, 168, H111 и P114. Эпитопные остатки 11G11 группировались в первичные участки последовательности, содержащие остатки 56-76 (QVNWEQQDQLLAICNADLGWH, SEQ ID NO: 40)

и остатки 111-114 (НТYP; SEQ ID NO: 41) с другими потенциальными контактами в остатках 120-139 (GRIFLEVLESSVAENHARFQ SEQ ID NO: 42). См. фиг. 2B.

Аналогичные эксперименты с антителом 15A6 показали важные контактные точки у остатков H76, G74, L65, N58, 168, Q139, G135, L73, F107, N70, E60, H134, A132 и 1109. Остатки эпитопов 15A6 группировались в первичные участки последовательности, содержащие остатки 58-76 (NWEQQDQL-LAICNADLGWH, SEQ ID NO: 38) и остатки 107-109 (FCI) с другими потенциальными контактами в остатках 132-139 (AENHARFQ; SEQ ID NO: 43). См. фиг. 2C.

Все три эпитопа включают в себя остатки L65, 168, N70 и H76, что указывает на то, что эти остатки и эта область, т.е. остатки 65-76 (LLAICNADLGWH, SEQ ID NO: 44) или 58-76 с учетом только 15A6 и 22G2, представляют собой важную область ("сердцевинный эпитоп") для связывания антител к huTIGIT по настоящему изобретению.

Аналогичные эксперименты по связыванию huTIGIT с человеческим PVR/CD155 показали важные контактные точки в остатках Q56, N58, 168, N70, L73, G74, W75, H76, H111, T112, Y113, P114, D115 и G116, чьи контакты попадают преимущественно в эпитопные области, связанные антителами 22G2, 11G11 и 15A6.

Пример 5. Усиленный лизис клеток PVR⁺ NK-клетками, обработанными антителами к TIGIT.

Оценивали влияние антитела 22G2 к TIGIT человека на опосредованный NK-клетками лизис клеток PVR⁺ *in vitro*. Клетки P815 (мышинная клеточная линия мастоцитомы), как дикого типа, так и сконструированные для экспрессии человеческого PVR, подвергались воздействию NK-клеток человека в присутствии моноклонального антитела 22G2-IgG1, 22G2-IgG1.1 к huTIGIT или изотипического контроля.

Вкратце, человеческие NK-клетки, эффекторы, выделяли из цельной крови и инкубированы в течение ночи с IL-2. NK-клетки покрывали клетками-мишенями либо P815/PVR, либо P815 [мас.] при отношении E:T-клеток 10:1 или 20:1. Антитела добавляли в лунки в конечной концентрации 5 мкг/мл. Планшеты инкубировали в течение 2-4 ч и оценивали клеточный супернатант на высвобождение лактатдегидрогеназы (LDH), продукта мертвых или умирающих клеток.

Результаты представлены на фиг. 3. Процентный (%) специфический лизис рассчитывали как
$$\left[\frac{\text{исследуемый сигнал} - \text{средний спонтанный лизис}}{\text{средний максимальный лизис} - \text{средний спонтанный лизис}} \right] \times 100.$$

Блокада TIGIT с использованием антитела 22G2 к TIGIT снижает ингибирующую передачу сигналов на NK-клетки, что приводит к увеличению лизиса экспрессирующих PVR клеток-мишеней специфическим способом DNAM-1.

Пример 6. Активация CD8⁺ T-клеток антителом к TIGIT.

Проводили эксперименты для определения влияния антител к TIGIT человека, отдельно и в сочетании с антителом к PD-1 человека, на человеческие T-клетки, стимулированные антигенными пептидами. По предварительным данным было обнаружено, что PD-1⁺/TIGIT⁺ CD8⁺ T-клетки были более распространены в крови у здоровых доноров, подвергнутых воздействию коктейля антигенных пептидов (от CMV, EBV, гриппа и столбняка), чем в не подвергнутой воздействию крови. См. фиг. 4A. Производство IFN γ измерялось в крови, обработанной CEFT. См. фиг. 4B. Несмотря на то что моноклональное антитело 22G2 к TIGIT неэффективно в качестве монотерапии, оно усиливало способность анти-PD-1 стимулировать продукцию IFN γ из T-клеток человека, подвергнутых воздействию коктейля антигенных пептидов. См. также Chauvin et al. (2015) *J. Clin. Invest.* 125:2046, где эффект антитела 10D7 к TIGIT человека на опухолеспецифические CD8⁺ T-клетки человека определяли в мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC) у пациентов с меланомой, подвергшихся воздействию пептида NY-ESO-1, с одновременным введением анти-huPD-1 или без его одновременного введения.

Пример 7. Противоопухолевая активность антител к TIGIT в мышинной опухолевой модели CT26.

Антитела к TIGIT мыши исследовали на противоопухолевую активность отдельно и в сочетании с антителами к PD-1 мыши в сингенной модели аденокарциномы толстой кишки CT26. Используемые в этих экспериментах антитела к muTIGIT представляют собой мышинные суррогаты антител к huTIGIT по настоящему изобретению.

Вкратце, моноклональное антитело к muTIGIT (клон 4B1) получали с Fc-областью либо IgG2a мыши, либо с IgG1 D265A мыши (с уменьшенной эффекторной функцией), а также к muPD-1 (клон 4H2) с мышинной Fc-областью IgG1 D265A. Эти антитела и их комбинации вводили мышам вместе с изотипическим контролем IgG1 мыши для определения противоопухолевой активности в сингенной модели аденокарциномы толстой кишки CT26. Контрольное антитело IgG1, используемое для исследований, представляет собой рекомбинантное антитело к дифтерийному токсину человека с изотипом IgG1 мыши.

Пятнадцати мышам BALB/c на группу (всего 90 мышей) подкожно вводили 1×10^6 опухолевых клеток CT26 в день 0. Лечение начинали на 7-й день после имплантации. Опухоли измеряли, рандомизировали в группы лечения, чтобы иметь сопоставимые средние объемы опухолей (45-50 мм³), а затем подвергали воздействию внутрибрюшинно (IP) назначенным средством (200 мкг/доза) и снова в дни 10 и 14. Каждый эксперимент включал также 200 мкг/дозу контрольного антитела IgG1, и, таким образом, сам контрольный эксперимент IgG1 включал 400 мкг/дозу. Объемы опухолей измеряли два раза в неделю.

Результаты представлены на фиг. 5А, где показаны средние объемы опухолей для каждого эксперимента в зависимости от времени. Вариант с уменьшенной эффекторной функцией антитела к TIGIT (G1 D265A) не влиял на рост опухоли и не избавлял мышей от опухолей, тогда как IgG2a уменьшал рост опухоли и приводил к тому, что у трех из пятнадцати мышей не было опухоли на 35-й день. Комбинация антитела к TIGIT IgG2a с антителом к PD-1 была высокоэффективной для снижения роста опухоли и приводила к тому, что у десяти из пятнадцати мышей не было опухоли, тогда как комбинация G1 D265A к TIGIT с анти-PD-1 была несколько менее эффективной для уменьшения роста опухоли и приводила к тому, что у семи из пятнадцати мышей не было опухолей. Тем не менее, как антитела IgG2a, так и IgG1 D265A к TIGIT повышали активность антитела к PD-1, что приводило лишь к тому, что только у двух из пятнадцати мышей не было опухоли.

Аналогичные эксперименты проводили для сравнения анти-TIGIT в качестве монотерапии с комбинированной терапией анти-TIGIT/анти-PD-1 и анти-TIGIT/анти-CTLA-4. Как антитела к TIGIT, так и к PD-1 приводили к форме в виде Fc-инертного изотипа IgG1-D265A мыши и анти-CTLA-4 в качестве мышиного IgG2b. Самкам BALB/c имплантировали 1×10^6 опухолевых клеток в день 0, а антитела вводили внутривенно в дозе 10 мг/кг в дни 10, 14 и 17. Результаты представлены на фиг. 5В. Добавление анти-TIGIT для лечения с анти-PD-1 и анти-CTLA-4 значительно усиливало ингибирование роста опухоли (TGI), как видно из кривых комбинированной терапии, 56% TGI для анти-TIGIT/анти-PD-1 и 49% TGI для анти-TIGIT/анти-CTLA-4, по сравнению с 7, 18 и 13% TGI для монотерапии с анти-TIGIT, анти-PD-1 и анти-CTLA-4 соответственно. Комбинированная терапия также увеличивала количество мышей без опухолей в конце эксперимента с 1/10 до 5/10 для комбинации с анти-PD-1 и с 3/10 до 6/10 для комбинации с анти-CTLA-4.

Пример 8.

Другие свойства антител 15A6, 22G2, 11G11 и 10D7 к huTIGIT.

Различные другие анализы *in vitro* проводили для определения свойств выбранных антител по настоящему изобретению. Было обнаружено, что моноклональные антитела 15A6, 22G2, 11G11 и 10D7 к huTIGIT связываются с клетками Jurkat, экспрессирующими huTIGIT. Биоанализ клеток Jurkat/huTIGIT показал, что все антитела 15A6, 11G11 и 10D7 блокируют передачу сигналов PVR с приблизительно эквивалентной эффективностью, а антитело 22G2 приблизительно в два раза лучше ($IC_{50} = 0,21$ нМ). Было показано, что антитела 15A6 и 22G2 связываются с TIGIT от яванских макаков, по существу, с такими же аффинностями, что и с TIGIT человека, когда он экспрессируется на клетках CHO, тогда как 11G11 и 10D7 - нет. Например, антитело 22G2 IgG1.1f связывалось с TIGIT человека и обезьяны с K_D 0,09 нМ и 0,07 нМ соответственно, а также характеризовалось EC_{50} для связывания с $CD8^+$ Т-клетками 0,55 нМ и 0,28-0,58 нМ соответственно, но не связывалось с TIGIT крысы или мыши. Последующие эксперименты с первичными клетками, однако, показали, что 15A6 не связывается хорошо с супо TIGIT в этом контексте. Антитела 22G2 и 15A6 окрашивали человеческие лимфоциты, но не 22 другие ткани человека до концентрации 10 мкг/мл (головной мозг, мозжечок, сердце, печень, легкое, почка, селезенка, миндалина, тимус, толстая кишка, тонкая кишка, желудок, поджелудочная железа, кожа, скелетные мышцы, надпочечник, щитовидная железа, периферический нерв, простата, плацента, семенник и матка). Антитело 22G2 не увеличивало экспрессию 75 различных цитокинов и хемокинов (включая в себя GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-13, IL-2, IFN γ , IP-10) из цельной крови человека от восьми доноров при инкубации в дозе 10 мкг/мл в течение 20 ч, что указывает на низкий риск возникновения синдрома высвобождения цитокинов.

В отдельных экспериментах моноклональное антитело 22G2 IgG1.1f к TIGIT показало IC_{50} 15,4 и 5,72 нМ для блокады связывания TIGIT-mFc с клетками P815, сверхэкспрессирующими PVR человека и нектин-2 человека соответственно, когда каждый присутствовал в своей концентрации EC_{90} (14,1 и 12,8 нМ соответственно).

Было обнаружено, что антитело 22G2 IgG1.1f содержит единственный сайт N-гликозилирования в N310 в тяжелой цепи с профилем гликана, типичным для моноклональных антител, производимых в CHO.

Эти результаты показывают, что антитело 22G2 характеризуется идеальными свойствами для терапевтического использования в способах по настоящему изобретению, поскольку оно связывается с TIGIT, когда присутствует на поверхности клетки, оно ингибирует передачу сигналов PVR и нектин-2, не связывается с инородными тканями человека или не вызывает нежелательное высвобождение цитокинов или хемокинов, и оно связывается с супо TIGIT, что полезно при проведении токсикологических исследований для использования в исследованиях в поддержку одобрения регулируемыми органами.

Пример 9.

Выбор пациента на основании экспрессии TIGIT, DNAM, PVR и нектин-2.

Уровни экспрессии белков, связанных с путем TIGIT (TIGIT, PVR/CD155, нектин-2/CD112, DNAM/CD226), могут использоваться для направления лечения антителами к TIGIT по настоящему изобретению. Растворимые формы PVR и нектин-2 (sPVR и sNectin-2) могут быть обнаружены в сыворотке, например, с помощью ИФА или других обычных средств. TIGIT, PVR, нектин-2 и DNAM могут быть обнаружены на поверхности клеток, таких как опухолевые клетки, $CD8^+$ Т-клетки, регуляторные

T-клетки, NK-клетки или инфильтрирующие в опухоль миелоидные клетки, например путем иммуногистохимии (ИНС), проточной цитометрии (FACS) или масс-спектрометрических способов, включающих в себя масс-спектрометрию с жидкостной хроматографией (ЖХ-МС).

Без намерения ограничиться теорией лечение антителами к TIGIT по настоящему изобретению будет основано на блокировании связывания TIGIT с его лигандами, например PVR или нектином-2, на взаимодействие клетки и/или предотвращение взаимодействия TIGIT с DNAM на одной и той же клетке. Соответственно, опухоли или типы опухолей, наиболее вероятно отвечающие на такое лечение, будут те, в которых активность TIGIT играет важную роль в прогрессировании опухоли, так что блокирование такой активности TIGIT способствовало бы истощению опухоли. В частности, высокие уровни TIGIT⁺ TIL, такие как TIGIT⁺ CD8⁺ T-клетки, TIGIT⁺ T_{reg} или TIGIT⁺ NK-клетки, предполагают, что опухоли могут реагировать на антагонистическую анти-TIGIT терапию. Экспрессия DNAM на этих TIGIT⁺ TIL будет дополнительно предполагать, что опухоль может отвечать на лечение против TIGIT. Точно так же опухоли, которые экспрессируют высокие уровни лигандов TIGIT PVR и/или нектина-2, либо на самих опухолевых клетках, либо на инфильтрирующих в опухоли миелоидных клетках, также представляют собой хороших кандидатов для лечения антителами к TIGIT по настоящему изобретению.

Скрининг уровней экспрессии белков пути TIGIT может выполняться на уровне выбора терапевтической индикации или на индивидуальном уровне пациента ("стратификация пациента"). Например, уровни экспрессии могут быть определены в образцах тканей у многих пациентов, характеризующихся наличием каждой из ряда различных видов злокачественной опухоли, чтобы определить, какие типы злокачественных опухолей показывают профили экспрессии белка, предполагающие, что конкретный тип злокачественной опухоли будет поддаваться лечению антагонистическим моноклональным антителом к TIGIT по настоящему изобретению. Как только такое определение будет сделано для статистически адекватного количества образцов, анти-TIGIT терапия может быть рекомендована для любого отдельного пациента, страдающего от типа злокачественной опухоли, который, как ожидается, будет реагировать на анти-TIGIT терапию.

Альтернативно, вместо этого могут быть исследованы образцы от отдельных пациентов, чтобы помочь в принятии решений о лечении специально для этого пациента.

Поскольку соответствующие клетки, подлежащие исследованию на экспрессию белков пути TIGIT, представляют собой те, которые находятся в опухоли и окружающей микросреде, такой скрининг, вероятно, потребует получения образца опухоли, например, посредством биопсии или резекции.

Соответственно, настоящее изобретение также относится к способам идентификации типов опухолей или конкретных опухолей, которые представляют собой хороших кандидатов для лечения антагонистическими антителами к TIGIT по настоящему изобретению путем измерения уровней TIGIT в инфильтрирующих CD8⁺ T-клетках, T_{reg} или NK-клетках, и/или путем измерения экспрессии PVR и/или нектина-2 в опухолевых клетках или инфильтрирующих в опухоли миелоидных клетках.

В одном примере анти-TIGIT терапию используют вместо комбинированного лечения PD-1 или PD-L1, вместе с ним или в дополнение к нему. Опухоли, проявляющие высокую экспрессию PVR/нектина-2 и низкую экспрессию PD-L1, могут быть обработаны антителом к TIGIT в виде монотерапии или антителом к TIGIT в сочетании с другим иммуно-онкологическим средством, отличным от антагониста PD-1/PD-L1, если существует биологическое обоснование для такого средства. Антитела к TIGIT по настоящему изобретению могут быть введены, по существу, одновременно с антителами к PD-1/PD-L1 в опухолях с высокой экспрессией PVR/нектина-2, а также с высокой экспрессией PD-L1. Альтернативно, антитела к TIGIT по изобретению могут вводиться после терапии анти-PD-1/PD-L1 у пациентов с рефрактерным состоянием, пациентов с рецидивами или пациентов с любым другим неполным или неудовлетворительным ответом, если их опухоли проявляют повышенную экспрессию PVR и/или нектина-2.

В экспериментах для идентификации типов опухолей, которые вероятно будут подвергаться обработке антагонистическими антителами к TIGIT по настоящему изобретению, определяли экспрессию мРНК PVR человека для различных видов злокачественных опухолей человека с использованием наборов данных TCGA. Результаты представлены на фиг. 6А. Результаты представлены в порядке убывания, с опухолями с наивысшим уровнем мРНК PVR и, таким образом, наиболее вероятно пригодными для лечения антителами к TIGIT по настоящему изобретению, вверху.

PVR также обнаруживали на гораздо более высоком уровне в образце аденокарциномы толстой кишки, чем в контрольном образце эпителия толстой кишки посредством ИНС. См. фиг. 6В. Дальнейшие эксперименты с помощью ИНС показали повышенную экспрессию PVR в 100% образцов гепатоцеллюлярной злокачественной опухоли (10/10), 90% образцов злокачественной опухоли толстой и прямой кишки (9/10) и 44% образцов злокачественной опухоли яичников (4/9). Эти результаты показывают, что пациенты с этими видами злокачественных опухолей, особенно с гепатоцеллюлярными злокачественными опухолями и злокачественными опухолями толстой и прямой кишки, были бы хорошими кандидатами для лечения антагонистическими антителами к TIGIT по настоящему изобретению.

В настоящем изобретении также предусмотрены способы лечения, например лечение злокачественной опухоли толстой и прямой кишки, предусматривающие определение отсутствия внутриопухолевых бактерий *Fusobacterium nucleatum*, наличие которых предполагает, что опухоль может быть хорошим

кандидатом для лечения антителом к TIGIT по настоящему изобретению. Такие способы лечения также необязательно предусматривают введение антибиотика субъекту с внутриопухолевыми бактериями *Fusobacterium nucleatum*, например метронидазола, пиперациллина/тазобактума, тикарциллина/клавуланата, амоксициллина/сульбактума, ампициллина/сульбактума, эртупенема, имипенема, меропенема, клиндамицина или цефокситина.

Таблица 5. Сводная таблица перечня последовательностей

SEQ ID NO.	Описание
1	Полипептид TIGIT человека (NP_776160.2)
2	Домен VH 15A6
3	Домен A72S VH 15A6
4	Домен N112T VH 15A6
5	Домен A72S N112T VH 15A6
6	Домен VL 15A6
7	Домен VH 22G2
8	Домен H3Q VH 22G2
9	Домен VL 22G2
10	Домен VH 11G11
11	Домен VL 11G11
12	Домен VH 10D7
13	Домен VL 10D7
14	15A6 CDRH1
15	15A6 CDRH2
16	15A6 CDRH3
17	15A6 CDRL1
18	15A6 CDRL2
19	15A6 CDRL3
20	22G2 CDRH1
21	22G2 CDRH2
22	22G2 CDRH3
23	22G2 CDRL1
24	22G2 CDRL2
25	22G2 CDRL3
26	11G11 CDRH1
27	11G11 CDRH2
28	11G11 CDRH3
29	11G11 CDRL1
30	11G11 CDRL2
31	11G11 CDRL3
32	10D7 CDRH1
33	10D7 CDRH2
34	10D7 CDRH3
35	10D7 CDRL1
36	10D7 CDRL2
37	10D7 CDRL3
38	Эпитоп 22G2/15A6–остатки 58 – 76 huTIGIT
39	Эпитоп 22G2 –остатки 107 – 117 huTIGIT
40	Эпитоп 11G11–остатки 56 – 76 huTIGIT
41	Эпитоп 11G11–остатки 111 – 114 huTIGIT
42	Эпитоп 11G11–остатки 120 – 139 huTIGIT
43	Эпитоп 15A6–остатки 132 – 139 huTIGIT
44	Сердцевинный эпитоп 22G2/11G11/15A6 –остатки 65 – 76 huTIGIT
45	Константный домен IgG1f (человека)
46	Константный домен IgG1, аллотипический вариант (человека)
47	Константный домен IgG1.3 (человека)
48	Константный домен IgG1.1f (человека)
49	Константный домен Карра (человека)
50	Предшественник альфа PVR/CD155 (человека) NP_006496.4
51	Предшественник бета PVR/CD155 (человека) NP_001129240.1
52	Предшественник гамма PVR/CD155 (человека) NP_001129241.1
53	Предшественник дельта PVR/CD155 (человека) NP_001129242.2

Что касается последовательностей антител, то в перечне последовательностей представлены последовательности зрелых переменных областей тяжелой и легкой цепей, т.е. последовательности не включают в себя сигнальные пептиды.

Эквиваленты.

Специалисты в настоящей области техники узнают или смогут установить с использованием не более, чем стандартных экспериментов многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления, раскрытых в настоящем документе. Такие эквиваленты предназначены для охвата следующей формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с TIGIT (Т-клеточным иммунорецептором человека с доменами Ig и ITIM), причем переменные домены тяжелой и легкой цепи антитела получены из последовательностей V области тяжелой и легкой цепей зародышевой линии человека V4-61 и VL6 соответственно, где указанные антитело или фрагмент содержат CDRH1, CDRH2 и CDRH3 тяжелой цепи, содержащие последовательности SEQ ID NO: 20, 21 и 22 соответственно; и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 легкой цепи, содержащие последовательности SEQ ID NO: 23, 24 и 25 соответственно.

2. Выделенное антитело или фрагмент по п.1, содержащий одну или несколько тяжелых цепей, содержащих переменную область тяжелой цепи и одну или несколько легких цепей, содержащих переменную область легкой цепи, причем переменная область тяжелой цепи характеризуется идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, по отношению к последовательности SEQ ID NO: 7 или 8, а переменная область легкой цепи характеризуется идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, по отношению к последовательности SEQ ID NO: 9.

3. Выделенное антитело по п.2, причем антитело содержит вариант последовательности Fc человеческого IgG1 с уменьшенной или отсутствующей эффекторной функцией по сравнению с эффекторной функцией последовательности Fc человеческого IgG1 дикого типа.

4. Выделенное антитело по п.3, содержащее следующие мутации: L234A, L235E, G237A, A330S и P331S (SEQ ID NO: 48) по нумерации EU.

5. Выделенное антитело по п.4, причем антитело содержит:

а) тяжелую цепь, содержащую переменную область с последовательностью SEQ ID NO: 7 и константную область с последовательностью SEQ ID NO: 48;

б) легкую цепь, содержащую переменную область с последовательностью SEQ ID NO: 9 и константную область с последовательностью SEQ ID NO: 49.

6. Нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область тяжелой и легкой цепи антитела или фрагмента по любому из предшествующих пунктов.

7. Нуклеиновая кислота по п.6, кодирующая переменную область тяжелой и легкой цепи антитела по п.5.

8. Нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область тяжелой цепи антитела или фрагмента по любому из пп.1-5.

9. Нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область легкой цепи антитела или фрагмента по любому из пп.1-5.

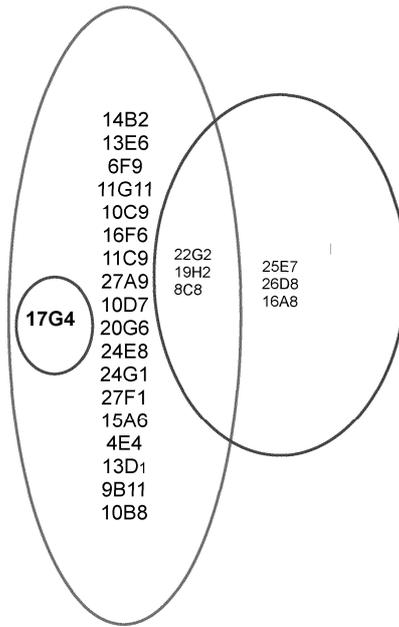
10. Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по п.7.

11. Клетка-хозяин, экспрессирующая антитело, трансформированная вектором экспрессии по п.10.

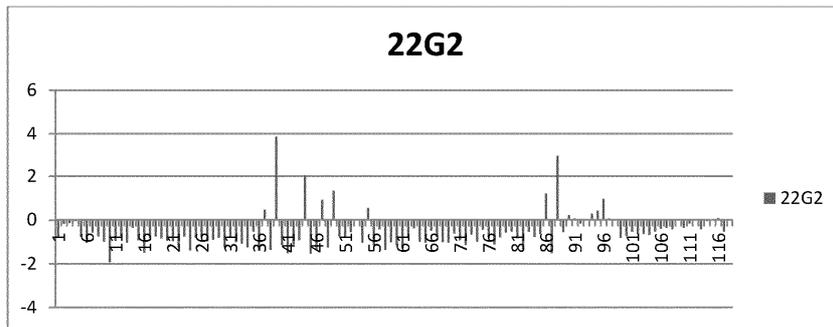
12. Способ получения антитела к TIGIT, включающий культивирование клетки-хозяина по п.11 в условиях, которые позволяют получить антитело или фрагмент, и очистку антитела или фрагмента от клетки.

13. Способ лечения злокачественной опухоли, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества антитела или фрагмента по любому из пп.1-5.

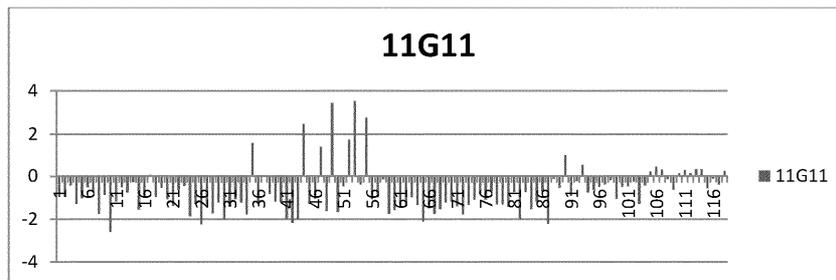
14. Способ по п.13, дополнительно включающий введение одного или нескольких дополнительных терапевтических средств, выбранных из группы, состоящей из антитела к PD-1, антитела к LAG-3, антитела к CTLA-4 и антитела к PD-L1.



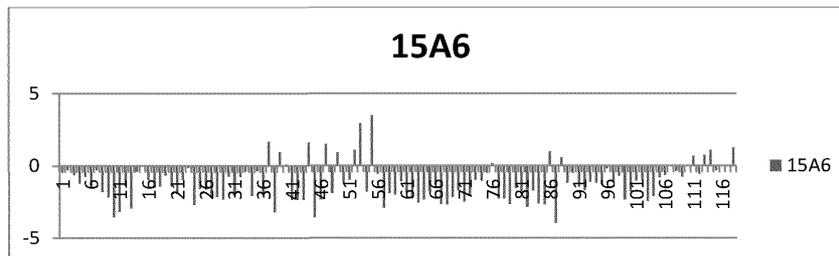
Фиг. 1



Фиг. 2A

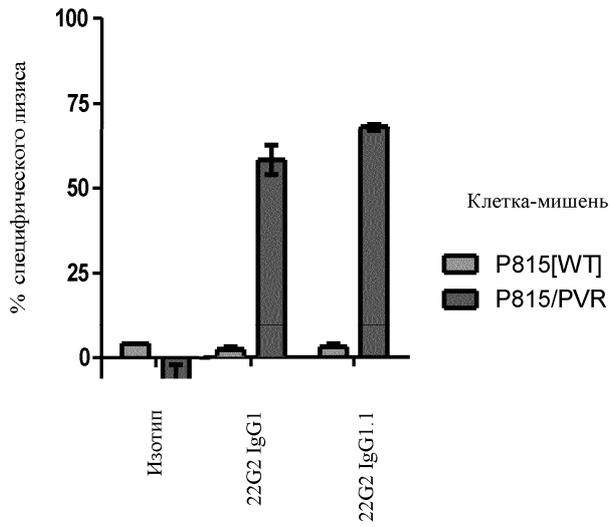


Фиг. 2B



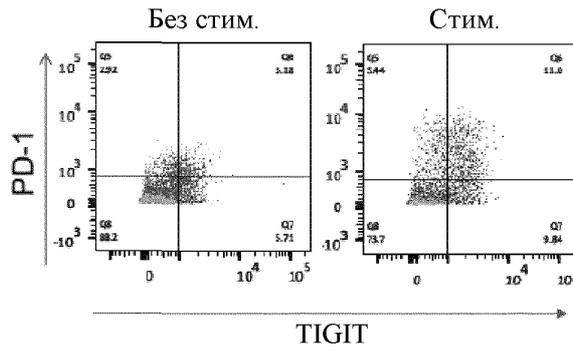
Фиг. 2C

Лизис NK-клеток P815/PVR



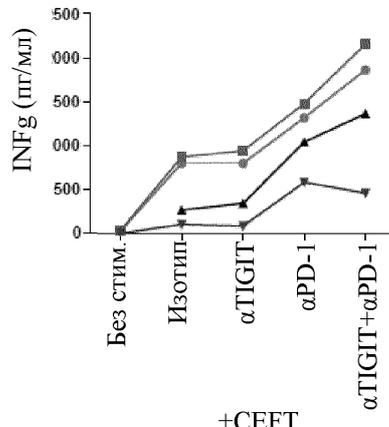
Фиг. 3

Повышение экспрессии TIGIT и PD1 на CD8⁺ Т-клетках

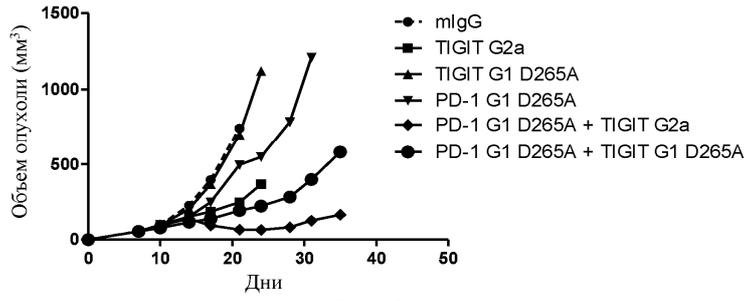


Фиг. 4А

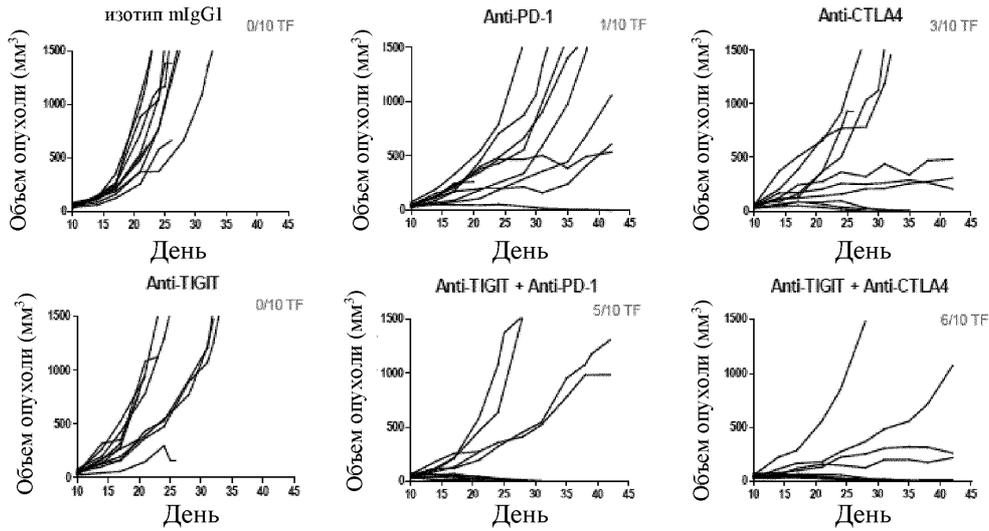
Увеличение производства INFg



Фиг. 4В

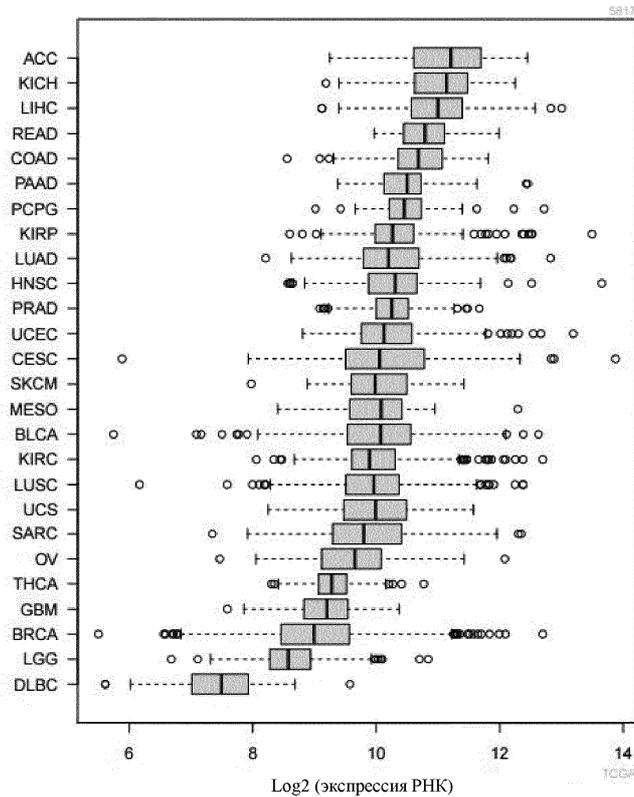


Фиг. 5А

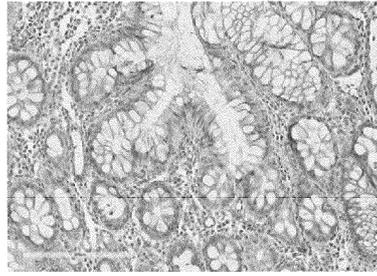


Фиг. 5В

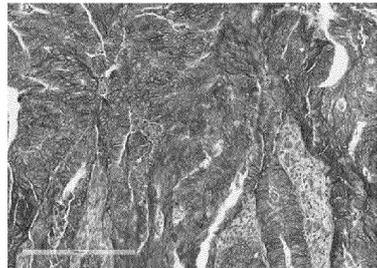
Экспрессия PVR в данных RNAseq TCGA



Фиг. 6А

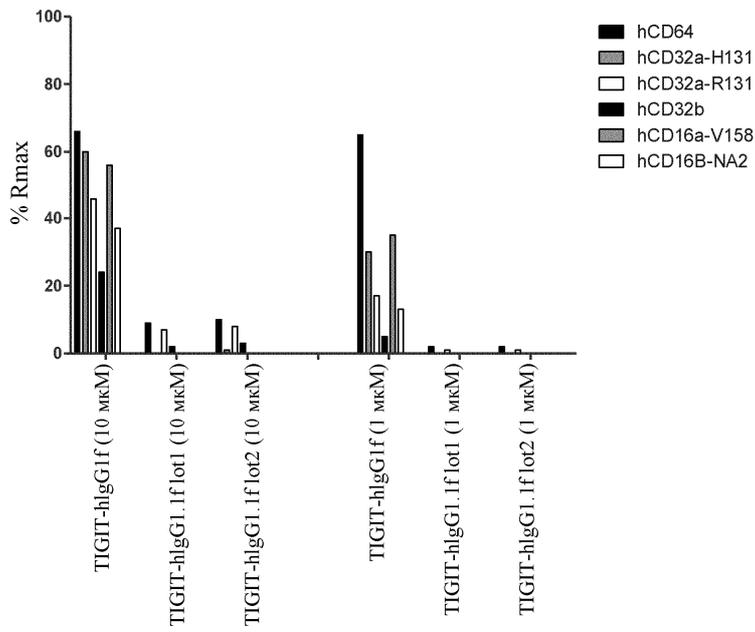


Эпителий толстого кишечника



Аденокарцинома толстого кишечника

Фиг. 6В



Фиг. 7



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2