(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 039540 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.02.08

(21) Номер заявки
201792460

(22) Дата подачи заявки
2016.05.27

(51) Int. Cl. *C07K 14/47* (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)

(54) СВЯЗЫВАЮЩИЕ TIGIT АГЕНТЫ И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **62/167,582; 62/205,279; 62/313,487**
(32) **2015.05.28; 2015.08.14; 2016.03.25**
(33) **US**
(43) **2018.06.29**
(86) **PCT/US2016/034549**
(87) **WO 2016/191643 2016.12.01**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ОНКОМЕД ФАРМАСЬЮТИКАЛС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Герни Остин, Се Мин-Хун (US)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) US-A1-20090258013
Stanietsky et al. "The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity" PNAS (October 20, 2009), vol. 106, no. 42, 17858-17863; pg 17858, col 2, para 2, fig. S1 legend
US-A1-20120213774
US-A1-20140271664
US-A1-20040185040
US-A1-20070072797

(57) Раскрыты агенты, которые специфически связывают TIGIT. Указанные связывающие TIGIT агенты могут включать полипептиды, антитела и/или биспецифические агенты. Также предложены способы применения указанных агентов для усиления иммунного ответа и/или лечения заболеваний, таких как рак.

039540 B1

039540 B1

Перекрестные ссылки на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/167582, поданной 28 мая 2015 г., предварительной заявке на патент США № 62/205279, поданной 14 августа 2015 г., и предварительной заявке на патент США № 62/313487, поданной 25 марта 2016 г., каждая из которых включена в настоящий документ полностью посредством ссылки.

Область техники

Изобретение относится в целом к агентам, которые связывают TIGIT, в частности антителам, которые специфически связывают внеклеточный домен TIGIT, а также к способам применения указанных агентов для модуляции иммунного ответа и/или для лечения заболеваний, таких как рак.

Уровень техники

Основой иммунотерапии являются манипуляции с иммунной системой и/или модуляция иммунной системы, включая как врожденный иммунный ответ, так и адаптивный иммунный ответ. Общей целью иммунотерапии является лечение заболеваний путем управления иммунным ответом на "чужеродный агент", например на патоген или опухолевую клетку. Однако в некоторых случаях иммунотерапию применяют для лечения аутоиммунных заболеваний, которые могут возникать в результате аномального иммунного ответа против белков, молекул и/или тканей, присутствующих в здоровом организме. Иммунотерапия может включать агенты и способы для индукции или усиления специфического иммунного ответа или для ингибирования или снижения специфического иммунного ответа.

Иммунная система представляет собой систему высокой сложности, состоящую из значительного числа типов клеток, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, Т-клеток, В-клеток, естественных клеток-киллеров, антигенпрезентирующих клеток, дендритных клеток, моноцитов и макрофагов. Указанные клетки обладают сложными чувствительными системами для управления их взаимодействиями и ответами. Указанные клетки используют как активирующие, так и ингибиторные механизмы, и петли обратной связи для обеспечения контроля ответов и предотвращения отрицательных последствий неконтролируемого иммунного ответа (например, аутоиммунных заболеваний).

Концепция иммунологического надзора при раке основана на теории, согласно которой иммунная система способна распознавать опухолевые клетки, организовать иммунный ответ и подавлять развитие и/или прогрессирование опухоли. Однако ясно, что многие раковые клетки обладают развитыми механизмами ускользания от иммунной системы, которые могут обеспечивать неингибируемый рост опухолей. Иммунотерапия раковых заболеваний/опухоли сфокусирована на разработке новых ранее неизвестных агентов, которые могут активировать и/или дополнительно стимулировать иммунную систему для обеспечения более эффективной атаки против опухолевых клеток, приводящей к повышению киллинга опухолевых клеток и/или ингибированию роста опухоли.

Краткое описание изобретения

В изобретении предложены различные агенты, которые связывают Т-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и ITIM (TIGIT), в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, антитела, которые специфически связывают внеклеточный домен TIGIT. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент представляет собой антагонист TIGIT. В настоящем изобретении предложены способы применения указанных агентов. Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложены способы применения указанных агентов для иммунотерапии. Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложены способы применения указанных агентов для иммунотерапии раковых заболеваний. Согласно некоторым вариантам реализации указанные агенты применяют в способах индукции иммунного ответа, активации иммунного ответа, стимуляции иммунного ответа, повышения, усиления или увеличения продолжительности иммунного ответа. Согласно некоторым вариантам реализации указанные агенты применяют в способах индукции иммунного ответа, активации иммунного ответа, стимуляции иммунного ответа, повышения, усиления или увеличения продолжительности иммунного ответа на раковое образование и/или опухоль. Согласно некоторым вариантам реализации указанные агенты применяют в способах ингибирования роста опухоли или опухолевых клеток. Согласно некоторым вариантам реализации указанные агенты применяют в способах лечения различных видов рака. Согласно некоторым вариантам реализации указанные способы включают ингибирование роста раковых клеток. Согласно некоторым вариантам реализации указанные агенты применяют в комбинации по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим агентом.

В настоящем изобретении также предложены композиции, такие как фармацевтические композиции, содержащие агенты, описанные в настоящем документе. Также предложены полинуклеотиды и/или векторы, кодирующие указанные агенты, и способы получения указанных агентов. Предложены клетки, содержащие или продуцирующие агенты, описанные в настоящем документе, а также клетки, содержащие полинуклеотиды и/или векторы, описанные в настоящем документе.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложены агенты, которые связывают TIGIT. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент связывает TIGIT мыши. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент связывает TIGIT человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент связывает TIGIT мыши и TIGIT человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент представляет собой антитело. Согласно некоторым вариантам реализации

указанный агент представляет собой антитело, которое связывает TIGIT мыши. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент представляет собой антитело, которое связывает TIGIT человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент представляет собой антитело, которое связывает TIGIT мыши и TIGIT человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент представляет собой антитело, которое связывает TIGIT человека и не связывает TIGIT мыши.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент представляет собой антитело, специфически связывающее внеклеточный домен TIGIT, которое содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащий GSSLSSSYMS (SEQ ID NO: 7) или GFSLSSSYMS (SEQ ID NO: 13), CDR2 тяжелой цепи, содержащий IIGSNGNTYYANWAKG (SEQ ID NO: 8), и CDR3 тяжелой цепи, содержащий GGYRTSGMDP (SEAQ ID NO: 9), и/или CDR1 легкой цепи, содержащий QASQSISSYLNW (SEQ ID NO: 10), QASQSNIYSDLAW (SEQ ID NO: 14) или QASQNIYSDLAW (SEQ ID NO: 81), CDR2 легкой цепи, содержащий DALKLAS (SEQ ID NO: 11) или RASTLAS (SEQ ID NO: 15), и CDR3 легкой цепи, содержащий QQEHSVGNVDN (SEQ ID NO: 12) или QQEHLVAWIYN (SEQ ID NO: 16). Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент представляет собой антитело, которое содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащий GSSLSSSYMS (SEQ ID NO: 7), CDR2 тяжелой цепи, содержащий IIGSNGNTYYANWAKG (SEQ ID NO: 8), и CDR3 тяжелой цепи, содержащий GGYRTSGMDP (SEQ ID NO: 9), и/или CDR1 легкой цепи, содержащий QASQSISSYLNW (SEQ ID NO: 10), CDR2 легкой цепи, содержащий DALKLAS (SEQ ID NO: 11), и CDR3 легкой цепи, содержащий QQEHSVGNVDN (SEQ ID NO: 12). Согласно другим вариантам реализации указанный агент представляет собой антитело, которое содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащий GFSLSSSYMS (SEQ ID NO: 13), CDR2 тяжелой цепи, содержащий IIGSNGNTYYANWAKG (SEQ ID NO: 8), и CDR3 тяжелой цепи, содержащий GGYRTSGMDP (SEQ ID NO: 9); и/или CDR1 легкой цепи, содержащий QASQSNIYSDLAW (SEQ ID NO: 14), CDR2 легкой цепи, содержащий RASTLAS (SEQ ID NO: 15), и CDR3 легкой цепи, содержащий QQEHLVAWIYN (SEQ ID NO: 16). Согласно другим вариантам реализации указанный агент представляет собой антитело, которое содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащий GFSLSSSYMS (SEQ ID NO: 13), CDR2 тяжелой цепи, содержащий IIGSNGNTYYANWAKG (SEQ ID NO: 8), и CDR3 тяжелой цепи, содержащий GGYRTSGMDP (SEQ ID NO: 9); и/или CDR1 легкой цепи, содержащий QASQNIYSDLAW (SEQ ID NO: 81), CDR2 легкой цепи, содержащий RASTLAS (SEQ ID NO: 15), и CDR3 легкой цепи, содержащий QQEHLVAWIYN (SEQ ID NO: 16).

Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент представляет собой антитело, специфически связывающее внеклеточный домен TIGIT, характеризующийся тем, что указанное антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, отличающуюся по меньшей мере 90% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO: 32; и/или вариабельную область легкой цепи, отличающуюся по меньшей мере 90% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 20. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, отличающуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO: 32; и/или вариабельную область легкой цепи, отличающуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 20. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 17, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 18; вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 19, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 20; или вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 32, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 20.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент представляет собой антитело, специфически связывающее внеклеточный домен TIGIT человека, которое содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащий TSDYAWN (SEQ ID NO: 57), CDR2 тяжелой цепи, содержащий YISYSGSTSYNPSLRS (SEQ ID NO: 58), и CDR3 тяжелой цепи, содержащий ARRQVGLGFAY (SEQ ID NO: 59), и/или CDR1 легкой цепи, содержащий KASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 60), CDR2 легкой цепи, содержащий SASYRYT (SEQ ID NO: 61), и CDR3 легкой цепи, содержащий QQHYSTP (SEQ ID NO: 62).

Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент представляет собой антитело, специфически связывающее внеклеточный домен TIGIT, характеризующийся тем, что указанное антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, отличающуюся по меньшей мере 90% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 63 или SEQ ID NO: 67; и/или вариабельную область легкой цепи, отличающуюся по меньшей мере 90% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 64 или SEQ ID NO: 68. Согласно некоторым вариантам реализации антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, отличающуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 63 или SEQ ID NO: 67; и/или вариабельную область легкой цепи, отличающуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 64 или SEQ ID NO: 68. Согласно некоторым вариантам реализации антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 63, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 64, или вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 67 и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 68.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент представляет собой антитело, которое представляет собой моноклональное антитело, гуманизированное антитело, антитело человека, рекомби-

нантное антитело, химерное антитело, биспецифическое антитело, фрагмент антитела, содержащий антигенсвязывающий сайт, антитело IgG, антитело IgG1, антитело IgG2 или антитело IgG4. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело является моновалентным. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело является бивалентным. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело является моноспецифическим. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело является биспецифическим.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент представляет собой антитело, специфически связывающее TIGIT, характеризующееся тем, что указанное антитело содержит последовательность аминокислот тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 34 и SEQ ID NO: 56; и последовательность аминокислот легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 30. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит последовательность аминокислот тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 26, и последовательность аминокислот легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 28; последовательность аминокислот тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 27, и последовательность аминокислот легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 28; последовательность аминокислот тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 29, и последовательность аминокислот легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 30; последовательность аминокислот тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 34, и последовательность аминокислот легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 30; или последовательность аминокислот тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 56, и последовательность аминокислот легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 30.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело, специфически связывающее TIGIT человека, содержит последовательность аминокислот тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 70, и последовательность аминокислот легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 72.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело, специфически связывающее TIGIT человека, содержит последовательность аминокислот тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 82, и последовательность аминокислот легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 72.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело, специфически связывающее TIGIT человека, не связывает TIGIT мыши. Согласно некоторым вариантам реализации антитело, специфически связывающее TIGIT человека, не связывает TIGIT крысы. Согласно некоторым вариантам реализации антитело, специфически связывающее TIGIT человека, не связывает TIGIT кролика. Согласно некоторым вариантам реализации антитело, специфически связывающее TIGIT человека, не связывает TIGIT игрунковых. Согласно некоторым вариантам реализации антитело, специфически связывающее TIGIT человека, не связывает TIGIT собаки. Согласно некоторым вариантам реализации антитело, специфически связывающее TIGIT человека, не связывает TIGIT свиней. Согласно некоторым вариантам реализации антитело, специфически связывающее TIGIT человека, не связывает TIGIT яванского макака. Согласно некоторым вариантам реализации антитело, специфически связывающее TIGIT человека, не связывает TIGIT макака-резуса.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент представляет собой антитело, специфически связывающее TIGIT, характеризующийся тем, что указанное антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи из антитела, выбранного из группы, состоящей из: 313R11, 313R12, 313R14, 313R19 и 313R20. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело выбрано из группы, состоящей из: 313R11, 313R12, 313R14, 313R19 и 313R20. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело представляет собой 313R19. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, кодируемую плазмидой, депонированной в ATCC (Американской коллекции типовых культур) под номером PTA-122180. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит вариабельную область легкой цепи, кодируемую плазмидой, депонированной в ATCC под номером PTA-122181. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую вариабельную область тяжелой цепи, кодируемую плазмидой, депонированной в ATCC под номером PTA-122180. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит легкую цепь, содержащую вариабельную область легкой цепи, кодируемую плазмидой, депонированной в ATCC под номером PTA-122181. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, кодируемую плазмидой, депонированной в ATCC под номером PTA-122180, и вариабельную область легкой цепи, кодируемую плазмидой, депонированной в ATCC под номером PTA-122181. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит полипептид, кодируемый плазмидой, депонированной в ATCC под номером PTA-122180 и полипептид, кодируемый плазмидой, депонированной в ATCC под номером PTA-122181.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложена плазмида, депонированная в ATCC, которой присвоен номер PTA-122180, и плазмида, депонированная в ATCC, которой присвоен номер PTA-122181.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело, специфически связывающее TIGIT человека, содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи из антитела 313M32.

Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, кодируемую плазмидой, депонированной в ATCC под номером PTA-122346. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит полипептид, содержащий вариабельную область тяжелой цепи, кодируемую плазмидой, депонированной в ATCC под номером PTA-122346. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит вариабельную область легкой цепи, кодируемую плазмидой, депонированной в ATCC под номером PTA-122347. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит легкую цепь, кодируемую плазмидой, депонированной в ATCC под номером PTA-122347. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, кодируемую плазмидой, депонированной в ATCC под номером PTA-122346, и вариабельную область легкой цепи, кодируемую плазмидой, депонированной в ATCC под номером PTA-122347. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит полипептид, кодируемый плазмидой, депонированной в ATCC под номером PTA-122346, и полипептид, кодируемый плазмидой, депонированной в ATCC под номером PTA-122347.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложена плазмида, депонированная в ATCC, которой присвоен номер PTA-122346, и плазмида, депонированная в ATCC, которой присвоен номер PTA-122347.

Согласно некоторым вариантам реализации каждого из вышеупомянутых аспектов и вариантов реализации, а также других аспектов и вариантов реализации, описанных в настоящем документе, указанный агент является моновалентным. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент является бивалентным. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент является моноспецифическим. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент является биспецифическим. Согласно некоторым вариантам реализации указанный биспецифический агент представляет собой гетеродимерный агент или гетеродимерную молекулу. Согласно некоторым вариантам реализации гетеродимерный агент содержит антитело, описанное в настоящем документе, которое специфически связывает TIGIT.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложено выделенное антитело, которое конкурирует за специфическое связывание с TIGIT человека с агентом (например, антителом), описанным в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации выделенное антитело связывает тот же самый эпитоп на TIGIT человека, что и агент (например, антитело), описанный в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации выделенное антитело связывает эпитоп на TIGIT человека, перекрывающийся с эпитопом на TIGIT, который связывает агент (например, антитело), описанный в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации антитело, специфически связывающее TIGIT человека, связывает эпитоп, содержащий аминокислоты, входящие в состав последовательности SEQ ID NO: 79. Согласно некоторым вариантам реализации антитело, специфически связывающее TIGIT человека, связывает эпитоп, содержащий аминокислоты, входящие в состав последовательности SEQ ID NO: 80. Согласно некоторым вариантам реализации антитело, специфически связывающее TIGIT человека, связывает эпитоп, содержащий аминокислоты, входящие в состав последовательностей SEQ ID NO: 79 и SEQ ID NO: 80. Согласно некоторым вариантам реализации антитело, специфически связывающее TIGIT человека, связывает эпитоп, содержащий аминокислоты Q62 и I109 последовательности SEQ ID NO: 4. Согласно некоторым вариантам реализации антитело, специфически связывающее TIGIT человека, связывает эпитоп, содержащий аминокислоты Q62 и T119 последовательности SEQ ID NO: 4. Согласно некоторым вариантам реализации антитело, специфически связывающее TIGIT человека, связывает эпитоп, содержащий аминокислоты Q64 и I109 последовательности SEQ ID NO: 4. Согласно некоторым вариантам реализации антитело, специфически связывающее TIGIT человека, связывает эпитоп, содержащий аминокислоты Q64 и T119 последовательности SEQ ID NO: 4. Согласно некоторым вариантам реализации антитело, специфически связывающее TIGIT человека, связывает эпитоп, содержащий аминокислоты Q62, Q64 и I109 последовательности SEQ ID NO: 4. Согласно некоторым вариантам реализации антитело, специфически связывающее TIGIT человека, связывает эпитоп, содержащий аминокислоты Q62, Q64 и T119 последовательности SEQ ID NO: 4. Согласно некоторым вариантам реализации антитело, специфически связывающее TIGIT человека, связывает эпитоп, содержащий аминокислоты Q62, I109 и T119 последовательности SEQ ID NO: 4. Согласно некоторым вариантам реализации антитело, специфически связывающее TIGIT человека, связывает эпитоп, содержащий аминокислоты Q64, I109 и T119 последовательности SEQ ID NO: 4. Согласно некоторым вариантам реализации антитело, специфически связывающее TIGIT человека, связывает эпитоп, содержащий аминокислоты Q62, Q64, I109 и T119 последовательности SEQ ID NO: 4. Согласно некоторым вариантам реализации антитело, специфически связывающее TIGIT человека, связывает эпитоп, содержащий по меньшей мере одну аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из: N58, E60, Q62, Q64, L65, F107, I109, H111, T117, T119, G120 и R121 последовательности SEQ ID NO: 4. Согласно некоторым вариантам реализации указанный эпитоп представляет собой конформационный эпитоп. Согласно некоторым вариантам реализации антитело, специфически связывающее TIGIT человека, связывает эпитоп, который не содержит аминокислоту V100 последовательности SEQ ID NO: 4.

Согласно некоторым вариантам реализации каждого из вышеупомянутых аспектов и вариантов реализации, а также других аспектов и вариантов реализации, описанных в настоящем документе, агент,

который специфически связывает TIGIT, представляет собой антитело, характеризующееся тем, что указанное антитело представляет собой часть биспецифического агента. Согласно некоторым вариантам реализации биспецифический агент содержит первое плечо, которое связывает TIGIT, и второе плечо, которое связывает вторую мишень. Согласно некоторым вариантам реализации биспецифический агент содержит первое плечо, которое специфически связывает TIGIT, и второе плечо, при этом указанное первое плечо содержит антитело против TIGIT, описанное в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации биспецифический агент содержит первое плечо, которое связывает TIGIT, и второе плечо которое содержит антигенсвязывающий сайт из антитела. Согласно некоторым вариантам реализации биспецифический агент содержит первое плечо, которое связывает TIGIT, и второе плечо, которое специфически связывает PD-1, PD-L1, CTLA4, TIM-3, LAG-3, OX-40 или GITR. Согласно некоторым вариантам реализации биспецифический агент содержит первое плечо, которое связывает TIGIT, и второе плечо, которое специфически связывает опухолевый антиген. Согласно некоторым вариантам реализации биспецифический агент содержит первое плечо, которое связывает TIGIT, и второе плечо, которое содержит агент, стимулирующий иммунный ответ. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент, стимулирующий иммунный ответ, выбран из группы, состоящей из: гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМКСФ), макрофагального колониестимулирующего фактора (МКСФ), гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (ГКСФ), интерлейкина 2 (ИЛ-2), интерлейкина 3 (ИЛ-3), интерлейкина 12 (ИЛ-12), интерлейкина 15 (ИЛ-15), B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), лиганда 4-1BB, GITRL, OX-40L, антитела против CD3, антитела против CTLA4, антитела против PD-1, антитела против PD-L1, антитела против GITR, антитела против OX-40, антитела против LAG-3 и антитела против TIM-3.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный биспецифический агент представляет собой гетеродимерный агент или гетеродимерную молекулу. Согласно некоторым вариантам реализации указанный биспецифический агент представляет собой гомодимерный агент или гомодимерную молекулу. Согласно некоторым вариантам реализации гетеродимерная молекула содержит первое плечо, которое связывает TIGIT человека, и второе плечо, которое связывает вторую мишень. Согласно некоторым вариантам реализации гетеродимерная молекула содержит первое плечо, которое специфически связывает TIGIT человека, и второе плечо, при этом указанное первое плечо содержит антитело против TIGIT, описанное в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации гетеродимерная молекула содержит первое плечо, которое связывает TIGIT человека, и второе плечо, которое содержит антигенсвязывающий сайт из антитела, специфически связывающего вторую мишень. Согласно некоторым вариантам реализации гетеродимерная молекула представляет собой биспецифическое антитело. Согласно некоторым вариантам реализации гетеродимерная молекула содержит первое плечо, которое связывает TIGIT человека, и второе плечо, которое специфически связывает опухолевый антиген. Согласно некоторым вариантам реализации гетеродимерная молекула содержит первое плечо, которое связывает TIGIT человека, и второе плечо, которое специфически связывает PD-1, PD-L1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, OX-40, 4-1BB или GITR. Согласно некоторым вариантам реализации гетеродимерная молекула содержит первое плечо, которое связывает TIGIT, и второе плечо, которое содержит иммунотерапевтический агент. Согласно некоторым вариантам реализации указанный иммунотерапевтический агент выбран из группы, состоящей из: гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМКСФ), макрофагального колониестимулирующего фактора (МКСФ), гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (ГКСФ), интерлейкина 2 (ИЛ-2), интерлейкина 3 (ИЛ-3), интерлейкина 12 (ИЛ-12), интерлейкина 15 (ИЛ-15), B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), лиганда 4-1BB, GITRL, OX-40L, антитела против CD3, антитела против CTLA-4, антитела против PD-1, антитела против PD-L1, антитела против 4-1BB, антитела против GITR, антитела против OX-40, антитела против LAG-3 и антитела против TIM-3.

Согласно некоторым вариантам реализации гетеродимерная молекула, описанная в настоящем документе, содержит первое плечо, содержащее первый CH3-домен, и второе плечо, содержащее второй CH3-домен, при этом каждый CH3-домен модифицирован таким образом, чтобы стимулировать образование гетеродимеров. Согласно некоторым вариантам реализации указанные CH3-домены модифицированы на основании электростатических эффектов. Согласно некоторым вариантам реализации указанные CH3-домены модифицированы с применением принципа "выступы-во-впадины".

Согласно некоторым вариантам реализации биспецифический агент, описанный в настоящем документе, содержит первое плечо, содержащее первый CH3-домен, и второе плечо, содержащее второй CH3-домен, при этом каждый CH3-домен модифицирован таким образом, чтобы стимулировать образование гетеродимеров. Согласно некоторым вариантам реализации указанные CH3-домены модифицированы на основании электростатических эффектов. Согласно некоторым вариантам реализации указанные CH3-домены модифицированы с применением принципа "выступы-во-впадины".

Согласно некоторым вариантам реализации каждого из вышеупомянутых аспектов и вариантов реализации, а также других аспектов и вариантов реализации, описанных в настоящем документе, агент, описанный в настоящем документе, специфически связывает TIGIT и ингибирует связывание TIGIT с рецептором полиовируса (PVR). Согласно некоторым вариантам реализации агент специфически связывает TIGIT и ингибирует или блокирует взаимодействие между TIGIT и PVR. Согласно некоторым вари-

антам реализации агент специфически связывает TIGIT и ингибирует связывание TIGIT с PVR-L2. Согласно некоторым вариантам реализации агент специфически связывает TIGIT и ингибирует или блокирует взаимодействие между TIGIT и PVR-L2. Согласно некоторым вариантам реализации агент специфически связывает TIGIT и ингибирует связывание TIGIT с PVR-L3. Согласно некоторым вариантам реализации агент специфически связывает TIGIT и ингибирует или блокирует взаимодействие между TIGIT и PVR-L3. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент представляет собой антагонист TIGIT. Согласно некоторым вариантам реализации агент специфически связывает TIGIT и ингибирует сигнализацию TIGIT. Согласно некоторым вариантам реализации агент специфически связывает TIGIT и представляет собой антагонист опосредованной TIGIT сигнализации. Согласно некоторым вариантам реализации агент специфически связывает TIGIT и ингибирует активацию TIGIT. Согласно некоторым вариантам реализации агент специфически связывает TIGIT и ингибирует фосфорилирование TIGIT. Согласно некоторым вариантам реализации агент специфически связывает TIGIT и снижает экспрессию TIGIT на поверхности клеток.

Согласно некоторым вариантам реализации каждого из вышеупомянутых аспектов и вариантов реализации, а также других аспектов и вариантов реализации, описанных в настоящем документе, агент, описанный в настоящем документе, специфически связывает TIGIT и индуцирует иммунный ответ, активирует иммунный ответ, стимулирует иммунный ответ, повышает, усиливает иммунный ответ и/или увеличивает продолжительность иммунного ответа. Согласно некоторым вариантам реализации указанный иммунный ответ направлен на опухоль или опухолевую клетку. Согласно некоторым вариантам реализации указанный иммунный ответ направлен на вирус или инфицированную вирусом клетку. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент повышает клеточный иммунитет. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент повышает Т-клеточную активность. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент повышает цитолитическую Т-клеточную (CTL) активность. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент повышает активность естественных клеток-киллеров (NK). Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент увеличивает продуцирование ИЛ-2 и/или число продуцирующих ИЛ-2 клеток. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент увеличивает продуцирование ИФН-γ и/или число продуцирующих ИФН-γ клеток. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент повышает иммунный ответ Th1-типа. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент уменьшает продуцирование ИЛ-4 и/или число продуцирующих ИЛ-4 клеток. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент уменьшает ИЛ-10 и/или число продуцирующих ИЛ-10 клеток. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент уменьшает продуцирование ИЛ-6 и/или число продуцирующих ИЛ-6 клеток. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент уменьшает продуцирование ИЛ-5 и/или число продуцирующих ИЛ-5 клеток. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент снижает иммунный ответ Th2-типа. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент уменьшает число клеток Treg. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент снижает активность Treg. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент ингибирует и/или снижает супрессорную активность клеток Treg. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент уменьшает число клеток СКМП. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент ингибирует и/или снижает супрессорную активность супрессорных клеток миелоидного происхождения (клеток СКМП).

Согласно некоторым вариантам реализации каждого из вышеупомянутых аспектов и вариантов реализации, а также других аспектов и вариантов реализации, описанных в документе, агент, описанный в настоящем документе, специфически связывает TIGIT и ингибирует рост опухоли. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент снижает рост опухоли. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент снижает рост опухоли до недетектируемого размера. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент индуцирует долгосрочный противоопухолевый иммунитет.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложены композиции, содержащие агент, описанный в настоящем документе. Также предложены способы применения композиции, содержащей агент, описанный в настоящем документе.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложены фармацевтические композиции, содержащие агент, описанный в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель. Также предложены способы лечения рака и/или ингибирования роста опухоли у субъекта (например, у человека), включающие введение указанному субъекту эффективного количества композиции, содержащей агент, описанный в настоящем документе. Также предложены способы лечения вирусной инфекции у субъекта (например, у человека), включающие введение указанному субъекту эффективного количества композиции, содержащей агент, описанный в настоящем документе.

Согласно определенным вариантам реализации каждого из вышеупомянутых аспектов, а также других аспектов и/или вариантов реализации, описанных в различных разделах настоящего документа, указанный агент является выделенным. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент является по существу чистым.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложены полинуклеотиды, содержащие полинуклеотид, который кодирует агент, описанный в настоящем документе. Согласно некоторым вариан-

там реализации указанный полинуклеотид является выделенным. Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложены векторы, которые содержат указанные полинуклеотиды, а также клетки, которые содержат указанные векторы и/или указанные полинуклеотиды. Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении также предложены клетки, содержащие или продуцирующие агент, описанный в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации указанная клетка представляет собой моноклональную линию клеток.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложены способы модуляции иммунного ответа у субъекта. Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ модуляции иммунного ответа содержит способ индукции иммунного ответа, активации иммунного ответа, стимуляции иммунного ответа, повышения, усиления или увеличения продолжительности иммунного ответа у субъекта. Согласно некоторым вариантам реализации способ индукции иммунного ответа, активации иммунного ответа, стимуляции иммунного ответа, повышения, усиления или увеличения продолжительности иммунного ответа у субъекта включает введение терапевтически эффективного количества антитела, биспецифического агента или полипептида, описанных в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации способ индукции иммунного ответа, активации иммунного ответа, стимуляции иммунного ответа, повышения, усиления или увеличения продолжительности иммунного ответа у субъекта включает введение терапевтически эффективного количества гетеродимерного биспецифического агента или гомодимерного биспецифического агента, описанный в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации способ индукции иммунного ответа, активации иммунного ответа, стимуляции иммунного ответа, повышения, усиления или увеличения продолжительности иммунного ответа у субъекта включает введение терапевтически эффективного количества антитела, специфически связывающего TIGIT, описанного в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации способ индуцирования иммунного ответа у субъекта включает введение агента, описанного в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации способ активации иммунного ответа у субъекта включает введение агента, описанного в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации способ стимуляции иммунного ответа у субъекта включает введение агента, описанного в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации способ повышения иммунного ответа у субъекта включает введение агента, описанного в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации способ усиления иммунного ответа у субъекта включает введение агента, описанного в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации способ увеличения продолжительности иммунного ответа у субъекта включает введение агента, описанного в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации указанный иммунный ответ вызван антигенной стимуляцией. Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенная стимуляция представляет собой опухоль или опухолевую клетку. Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенная стимуляция представляет собой патоген. Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенная стимуляция представляет собой вирус. Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенная стимуляция представляет собой инфицированную вирусом клетку. Согласно некоторым вариантам реализации указанный иммунный ответ направлен против опухоли или рака.

Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложены способы повышения активности иммунных клеток. Согласно некоторым вариантам реализации способ повышения активности иммунных клеток включает приведение указанных клеток в контакт с эффективным количеством агента, описанного в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации указанные иммунные клетки представляют собой Т-клетки, NK-клетки, моноциты, макрофаги, клетки миелоидного происхождения, антигенпрезентирующие клетки (клеток АПК) и/или В-клетки. Согласно некоторым вариантам реализации способ повышения активности NK-клеток у субъекта включает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества агента, описанного в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации способ повышения активности Т-клеток у субъекта включает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества агента, описанного в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации способ повышения активации Т-клеток и/или NK-клеток у субъекта включает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества агента, описанного в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации способ повышения Т-клеточного ответа у субъекта включает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества агента, описанного в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации способ повышения активности клеток CTL у субъекта включает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества агента, описанного в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации способ ингибирования активности клеток Treg у субъекта включает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества агента, описанного в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации способ ингибирования супрессорной активности клеток Treg у субъекта включает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества агента, описанного в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации способ ингибирования активности клеток СКМП у субъекта включает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества агента, описанного в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам

реализации способ ингибирования супрессорной активности клеток СКМП у субъекта включает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества агента, описанного в настоящем документе.

Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложены способы индукции иммунного ответа, активации иммунного ответа, стимуляции иммунного ответа, повышения, усиления или увеличения продолжительности иммунного ответа у субъекта, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества агента, который связывает TIGIT человека. Согласно некоторым вариантам реализации способ индукции иммунного ответа, активации иммунного ответа, стимуляции иммунного ответа, повышения, усиления или увеличения продолжительности иммунного ответа у субъекта включает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества агента, который ингибирует или снижает активность TIGIT. Согласно некоторым вариантам реализации способ индукции иммунного ответа, активации иммунного ответа, стимуляции иммунного ответа, повышения, усиления или увеличения продолжительности иммунного ответа у субъекта включает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества агента, который ингибирует или снижает сигнализацию TIGIT. Согласно некоторым вариантам реализации указанный иммунный ответ направлен против опухолевой клетки, опухоли или рака. Согласно некоторым вариантам реализации указанный иммунный ответ направлен против вирусной инфекции, вирусного антигена или инфицированной вирусом клетки.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложены способы ингибирования роста опухолевых клеток или опухоли, включающий приведение в контакт указанной опухоли или опухолевой клетки с эффективным количеством агента, описанного в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации способ ингибирования роста опухоли включает приведение в контакт опухоль или опухолевой клетки с эффективным количеством агента, который связывает TIGIT человека.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложены способы ингибирования роста опухоли у субъекта, включающие введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества агента, описанного в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации способ ингибирования роста опухоли у субъекта включает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества агента, который связывает TIGIT человека. Согласно некоторым вариантам реализации способ ингибирования роста опухоли у субъекта включает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества антитела, которое связывает TIGIT человека. Согласно некоторым вариантам реализации способ ингибирования роста опухоли у субъекта включает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества биспецифического агента, который связывает TIGIT человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанная опухоль выбрана из группы, состоящей из опухоли ободочной и прямой кишки, опухоли ободочной кишки, опухоли яичника, опухоли поджелудочной железы, опухоли легкого, опухоли печени, опухоли молочной железы, опухоли почки, опухоли предстательной железы, опухоли желудочно-кишечного тракта, меланомы, опухоли шейки матки, опухоли мочевого пузыря, глиобластомы и опухоли головы и шеи.

Согласно другому аспекту изобретения предложены способы лечения рака у субъекта, включающие введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества агента, описанного в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации способ лечения рака у субъекта включает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества агента, который связывает TIGIT. Согласно некоторым вариантам реализации способ лечения рака у субъекта включает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества антитела, которое связывает TIGIT человека. Согласно некоторым вариантам реализации способ лечения рака у субъекта включает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества биспецифического агента, который связывает TIGIT человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак выбран из группы, состоящей из рака ободочной и прямой кишки, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака легкого, рака печени, рака молочной железы, рака почки, рака предстательной железы, рака желудочно-кишечного тракта, меланомы, рака шейки матки, рака мочевого пузыря, глиобластомы и рака головы и шеи.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложены способы стимуляции и/или индукции долгосрочного противоопухолевого иммунитета у субъекта, включающие введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества агента, описанного в настоящем документе.

Согласно другому аспекту изобретения предложены способы стимуляции защитного ответа у субъекта, включающие введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества агента, описанного в настоящем документе, в комбинации с представляющим интерес антигеном. Согласно некоторым вариантам реализации указанный представляющий интерес антиген представляет собой опухолевый антиген. Согласно некоторым вариантам реализации указанный представляющий интерес антиген представляет собой биомаркер опухолевых клеток. Согласно некоторым вариантам реализации указанный представляющий интерес антиген представляет собой маркер стволовых опухолевых клеток.

Согласно некоторым вариантам реализации каждого из вышеупомянутых аспектов и вариантов реализации, а также других аспектов и вариантов реализации, описанных в настоящем документе, указанные

способы включают введение указанному субъекту стимулирующего иммунный ответ агента. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент, стимулирующий иммунный ответ, выбран из группы, состоящей из ГМКСФ, МКСФ, ГКСФ, ИЛ-3, ИЛ-12, ИЛ-1, ИЛ-2, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), антител против CD3, антител против CTLA-4, антител против CD28, антител против PD-L1 и антител против PD1.

Согласно некоторым вариантам реализации каждого из вышеупомянутых аспектов и вариантов реализации, а также других аспектов и вариантов реализации, описанных в настоящем документе, способ дополнительно включает введение по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента. Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент. Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой антитело. Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой антитело против PD-1, антитело против PD-L1, антитело против CTLA4, антитело против LAG-3 или антитело против TIM-3. Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой ингибитор пути Notch, пути Wnt или пути RSPO/LGR.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой иммунотерапевтический агент. В настоящем документе выражение "иммунотерапевтический агент" применяют в максимально широком смысле и относится к веществу, которое прямо или непрямо влияет или модулирует иммунную систему. Согласно некоторым вариантам реализации иммунотерапевтический агент представляет собой агент, который прямо или непрямо стимулирует иммунную систему путем индукции активации или повышения активности любых компонентов иммунной системы. Поскольку связывающие TIGIT агенты считаются иммунотерапевтическими агентами, указанный дополнительный иммунотерапевтический агент может считаться "вторым" иммунотерапевтическим агентом. Согласно некоторым вариантам реализации указанный второй иммунотерапевтический агент выбран из группы, состоящей из: ГМКСФ, МКСФ, ГКСФ, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-12, ИЛ-15, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), лиганда 4-1BB, GITRL, лиганда OX-40, антитела против CD3, антитела против CTLA-4, антитела против CD28, антитела против PD-1, антитела против PD-L1, антитела против 4-1BB, антитела против GITR, антитела против OX-40, антитела против LAG-3 и антитела против TIM-3. Согласно некоторым вариантам реализации указанный второй иммунотерапевтический агент представляет собой слитый белок, содержащий: ГМКСФ, МКСФ, ГКСФ, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-12, ИЛ-15, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), лиганда 4-1BB, GITRL, лиганда OX-40 или его фрагмента. Согласно некоторым вариантам реализации указанный второй иммунотерапевтический агент представляет собой слитый белок, содержащий по меньшей мере одну копию внеклеточного домена GITRL, лиганда OX40 или лиганда 4-1BB.

Согласно некоторым вариантам реализации каждого из вышеупомянутых аспектов и вариантов реализации, а также других аспектов и вариантов реализации, описанных в настоящем документе, указанный субъект представляет собой человека. Согласно некоторым вариантам реализации у указанного субъекта была, по меньшей мере частично, удалена опухоль или рак.

Согласно некоторым вариантам реализации каждого из вышеупомянутых аспектов и вариантов реализации, а также других аспектов и вариантов реализации, описанных в настоящем документе, указанная опухоль или указанный рак экспрессирует PD-L1. Согласно некоторым вариантам реализации способ дополнительно включает этап определения уровня экспрессии PD-L1 в указанной опухоли или указанном раке. Согласно некоторым вариантам реализации определение уровня экспрессии PD-L1 выполняют до лечения или контакта с агентом, описанным в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации в том случае, если указанная опухоль или указанный рак отличается повышенным уровнем экспрессии PD-L1, агент, описанный в настоящем документе, вводят указанному субъекту. Согласно некоторым вариантам реализации в том случае, если указанная опухоль или указанный рак отличается повышенным уровнем экспрессии PD-L1, указанная опухоль или указанный рак приводят в контакт с агентом, описанным в настоящем документе.

В том случае, если аспекты или варианты реализации настоящего изобретения описаны в терминах группы Маркуша или другой группы альтернатив, настоящим изобретением охвачена не только вся указанная группа в целом, однако также и каждый представитель указанной группы индивидуально, и все возможные подгруппы основной группы, а также указанная основная группа, в которой отсутствует один или более из представителей группы. Настоящее изобретение также может предусматривать явное исключение одного или нескольких представителей группы в заявленном изобретении.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1A и 1B - FACS-анализ антител кролика, продуцированных в ответ на TIGIT мыши. (A) Клетки HEK-293T транзиентно трансфицировали экспрессионным кДНК-вектором, кодирующим TIGIT мыши ECD-CD4TM-GFP (зеленый флуоресцентный белок) или ECD TIGIT человека-CD4TM-GFP. Трансфицированные клетки инкубировали с антителами кролика и анализировали с помощью проточной цитометрии. На специфическое связывание указывает присутствие диагонального сигнала на каждом графике FACS. (B) Клетки HEK-293T транзиентно трансфицировали экспрессионным кДНК-вектором, кодирующим TIGIT мыши-CD4TM-GFP. Трансфицированные клетки инкубировали с растворимым слитым белком PVR мыши/Fc в присутствии антител кролика, продуцированных в ответ на TIGIT мыши, или без

антитела, и анализировали с помощью проточной цитометрии. На специфическое связывание указывает присутствие диагонального сигнала на каждом графике FACS. Блокирование связывания показано как утрата специфического связывания и отмечено окружностью на графике FACS;

фиг. 2A и 2B - анализ методом вестерн-блоттинга фосфорилирования белка после взаимодействия TIGIT-PVR. Т-клетки человека Jurkat стабильно трансдуцировали FLAG-меченым TIGIT мыши/GFP, а клетки E.G7-OVA стабильно трансдуцировали PVR мыши/GFP. (A) Фосфорилирование TIGIT. (B) Фосфорилирование SHP1 и Erk1/2;

фиг. 3 - анализ фосфорилирования TIGIT методом вестерн-блоттинга после взаимодействия TIGIT-PVR в отсутствие или в присутствии антител против TIGIT;

фиг. 4 - анализ фосфорилирования SHP1 и Erk1/2 методом вестерн-блоттинга после взаимодействия TIGIT-PVR в отсутствие или в присутствии антител против TIGIT;

фиг. 5A и 5B - опосредованное TIGIT ингибирование продуцирования цитокинов. (A) секреция ИЛ-2 в Т-клетках B3Z и Т-клетках B3Z, экспрессирующих TIGIT. (B) Секреция ИЛ-2 в Т-клетках B3Z и Т-клетках B3Z, экспрессирующих TIGIT, после предварительной обработки антителами против TIGIT;

фиг. 6A и 6B - опосредованное TIGIT ингибирование активности естественных клеток-киллеров. (A) Цитотоксичность исходных клеток NK-92 и клеток NK-92, экспрессирующих TIGIT. (B) Цитотоксичность исходных клеток NK-92 и клеток NK-92, экспрессирующих TIGIT, после предварительной обработки антителами против TIGIT;

фиг. 7A и 7B - ингибирование роста опухоли антителами против TIGIT. Клетки линии опухоли ободочной кишки CT26.WT имплантировали подкожно мышам Balb/c (n=10 мышей/группу). Мышам инъецировали на 10, 15, 18, 22, 25 и 29 дни 0,25 мг/мышь антитела против TIGIT 313R11, антитела против TIGIT 313R12, контрольного антитела IgG1 мыши и контрольного антитела IgG2 мыши. Проводили мониторинг роста опухоли и измеряли объемы опухолей электронным калипером в заданные моменты времени. Данные приведены в виде объемов опухолей (мм^3) на протяжении дней после инъекции. (A) На фигурах приведены значения среднего ± SEM для каждой группы. (B) Дополнительное исследование с антителом против TIGIT 313R12 и контрольным антителом;

фиг. 8 - ингибирование роста опухоли антителами против TIGIT. Клетки линии опухоли ободочной кишки CT26.WT имплантировали подкожно мышам Balb/c (n=10 мышей/группу). Мышам инъецировали на 10, 14, 17 и 21 дни 0,25 мг/мышь антитела против TIGIT 313R12, антитела против TIGIT 313R13 и контрольного антитела IgG2 мыши. Проводили мониторинг роста опухоли и измеряли объемы опухолей электронным калипером в заданные моменты времени. Данные приведены в виде объемов опухолей (мм^3) на протяжении дней после инъекции. На фигурах приведены значения среднего ± SEM для каждой группы;

фиг. 9A-9D - анализы ELISpot на ИФН-γ, ИЛ-2, ИЛ-4 и ИЛ-10. Собирали клетки селезенок мышей-носителей опухолей CT26.WT, получавших лечение антителом против TIGIT 313R12, или контрольным антителом совпадающего изотипа. Клетки инкубировали в присутствии или в отсутствие пептида AH-1 и затем анализировали с применением наборов для ELISpot. (A) Показана общая оптическая плотность (TOD) клеток, продуцирующих ИФН-γ. (B) TOD клеток, продуцирующих ИЛ-2. (C) Показана TOD клеток, продуцирующих ИЛ-4 показан. (B) TOD клеток, продуцирующих ИЛ-10;

фиг. 10 - активность естественных клеток-киллеров в популяции спленоцитов мышей, получавших лечение антителом против TIGIT;

фиг. 11 - активность Treg в популяции спленоцитов мышей, получавших лечение антителом против TIGIT;

фиг. 12A-12E - FACS-анализ спленоцитов мышей, получавших лечение антителом против TIGIT. (A) Процент CD3+ клеток от общего числа живых клеток. (B) Процент CD4+ клеток от общего числа живых клеток. (C) Процент CD8+ клеток от общего числа живых клеток. (D) Процент CD4+ Т-клеток центральной памяти от общего числа клеток CD4+ популяции. (E) Процент CD8+ Т-клеток центральной памяти от общего числа клеток CD8+ популяции;

фиг. 13A-13D - FACS-анализ положительных или отрицательных по TIGIT клеток Treg в популяции спленоцитов мышей, получавших лечение антителом против TIGIT. (A) Процент положительных по TIGIT клеток от общего числа живых клеток. (B) Процент FoxP3+ клеток от общего числа CD4+ клеток (идентификация Treg). (C) Процент положительных по TIGIT клеток от общего числа клеток Treg. (D) Процент отрицательных по TIGIT клеток от общего числа клеток Treg;

фиг. 14A-14D - FACS-анализ клеток СКМП в популяции спленоцитов мышей, получавших лечение антителом против TIGIT. (A) Процент CD11b+ клеток от общего числа живых клеток. (B) Процент клеток СКМП от общего числа CD11b+ клеток. (C) Процент клеток ГСКМП от общего числа CD11b+ клеток. (D) Процент клеток МСКМП от общего числа CD11b+ клеток;

фиг. 15. - ингибирование роста опухоли антителами против TIGIT. Клетки Renca (почечная аденокарцинома мышей) имплантировали подкожно мышам Balb/c (n=10 мышей/группу). Мышам инъецировали на 7, 10, 14, 17, 21 и 24 дни 0,25 мг/мышь антитела против TIGIT 313R12 и контрольного антитела IgG2 мыши. Проводили мониторинг роста опухоли и измеряли объемы опухолей электронным калипе-

ром в заданные моменты времени. Данные приведены в виде объемов опухолей (мм^3) на протяжении дней после инъекции. На фигурах приведены значения среднего ± SEM для каждой группы;

фиг. 16 - ингибирование роста опухоли антителом против TIGIT 313R12 - исследование дозы. Клетки линии опухоли ободочной кишки мыши CT26.WT имплантировали подкожно мышам Balb/c (n=10 мышей/группу). Мыши получали лечение в виде 0,5, 1, 3, 5, 10, 15 или 30 мг/кг антитела против TIGIT 313R12 или контрольным антителом. Мышей дозировали путем внутрибрюшинной инъекции дважды в неделю, всего вводили 6 доз. Проводили мониторинг роста опухоли и измеряли объемы опухолей электронным калипером;

фиг. 17A-17F - ингибирование роста опухоли in vivo антителом против TIGIT 313R12 и антителом против PD-L1. Клетки линии опухоли ободочной кишки мыши CT26.WT имплантировали подкожно (30 000 клеток/мышь) мышам Balb/c. Мыши получали лечение в виде 0,25 мг/мышь антитела против TIGIT 313R12, антитела против PD-L1, комбинации 313R12 и антитела против PD-L1, или контрольного антитела (n=10 на группу). Мышам вводили антитела дважды в неделю в течение 3 недель. Проводили мониторинг роста опухоли и измеряли объемы опухолей электронным калипером в заданные моменты времени. (A) Объемы опухолей у отдельных мышей в группе, получавшей лечение контрольным антителом. (B) Объемы опухолей у отдельных мышей в группе, получавшей лечение антителом против TIGIT 313R12. (C) Объемы опухолей у отдельных мышей в группе, получавшей лечение антителом против PD-L1. (D) Объемы опухолей у отдельных мышей в группе, получавшей лечение антителом против TIGIT 313R12 и антителом против PD-L1. (E) Средний уровень роста опухоли для четырех экспериментальных групп. (F) Кривая выживания;

фиг. 18A-18E - ингибирование роста опухоли in vivo антителом против TIGIT 313R12 и антителом против PD-1. Клетки линии опухоли ободочной кишки мыши CT26.WT имплантировали подкожно (30000 клеток/мышь) мышам Balb/c. Мыши получали лечение в виде 0,25 мг/мышь антитела против TIGIT 313R12, антитела против PD-1, комбинации 313R12 и антитела против PD-1, или контрольного антитела (n=15 на группу). Мышам вводили антитела дважды в неделю в течение 3 недель. Проводили мониторинг роста опухоли и измеряли объемы опухолей электронным калипером в заданные моменты времени. (A) Объемы опухолей у отдельных мышей в группе, получавшей лечение контрольным антителом. (B) Объемы опухолей у отдельных мышей в группе, получавшей лечение антителом против TIGIT 313R12. (C) Объемы опухолей у отдельных мышей в группе, получавшей лечение антителом против PD-1. (D) Объемы опухолей у отдельных мышей в группе, получавшей лечение антителом против TIGIT 313R12 и антителом против PD-1. (E) Средний уровень роста опухоли для четырех экспериментальных групп;

фиг. 19A и 19B - FACS-анализ блокирования антителом против TIGIT связывания TIGIT человека с PVR. (A) Клетки HEK-293T транзиентно трансфицировали экспрессионным кДНК-вектором, кодирующим ECD TIGIT человека-CD4TM-GFP (зеленый флуоресцентный белок) или ECD TIGIT человека-CD4TM-GFP. Трансфицированные клетки инкубировали с растворимым слитым белком PVR человека/Fc в присутствии антител, продуцированных в ответ на TIGIT (313R19, 313M26 или 313M32) в концентрациях, составляющих 10, 2 или 0,4 мкг/мл, или без антитела, и анализировали с помощью проточной цитометрии. На специфическое связывание указывает присутствие диагонального сигнала на графике FACS. Блокирование связывания показано как утрата специфического связывания в темном прямоугольнике на графике FACS. (B) Клетки HEK-293T транзиентно трансфицировали экспрессионным кДНК-вектором, кодирующим ECD TIGIT человека-CD4TM-GFP (зеленый флуоресцентный белок) или ECD TIGIT человека-CD4TM-GFP. Трансфицированные клетки инкубировали с растворимым слитым белком PVR человека/Fc кролика в присутствии антител, продуцированных в ответ на TIGIT (313R19 или 313M32), в концентрациях, составляющих 10, 5, 2,5 или 1,25 мкг/мл, или без антитела, и анализировали с помощью проточной цитометрии. На специфическое связывание указывает присутствие диагонального сигнала на графике FACS. Блокирование связывания показано как утрата специфического связывания в темном прямоугольнике на графике FACS;

фиг. 20 - анализ фосфорилирования TIGIT методом вестерн-блоттинга после взаимодействия TIGIT-PVR в отсутствие или в присутствии антител против TIGIT 313R19, 313M26 и 313M32;

фиг. 21 - выравнивание последовательностей TIGIT человека (SEQ ID NO: 4), TIGIT яванского макака (SEQ ID NO: 77) и TIGIT макака-резуса (SEQ ID NO: 78);

фиг. 22 - картирование эпитопов посредством FACS-анализа связывания антитела против TIGIT с вариантами белков TIGIT человека, содержащими специфические замены аминокислот. Варианты hTIGIT представлены (1) E36K и I41V; (2) T51M, (3) Q62H и Q64H, (4) D72E, (5) S78Y и S80A, (6) V100M, (7) I109T и T119R, и (8) G135S;

фиг. 23 - диаграмма, представляющая PVR, связанный с TIGIT. Структура TIGIT человека представлена в виде сферы, а структура PVR - в виде ленты. Аминокислоты, включающие по меньшей мере часть эпитопа 313M32, изображены в виде черных сфер. Аминокислоты, включающие по меньшей мере часть эпитопа 313M34, изображены в виде серых сфер;

фиг. 24A и 24B - исследование конкурентного связывания антител против TIGIT. (A) Исследование конкуренции 313R19 и 313M26. (B) Исследование конкуренции 313M34 и 313R19, или 313M34 и

313M32;

фиг. 25 - обращение опосредованного PVR ингибирования секреции цитокинов антителами против TIGIT;

фиг. 26 - анализ антитело-зависимой клеточной цитотоксичности;

фиг. 27 - ингибирование роста опухоли антителами против TIGIT 313R19 и 313M32 в модели на гуманизированных мышах. Гуманизированным мышам подкожно инъецировали происходящие от пациентов опухолевые клетки меланомы (OMP-M9, 75000 клеток/мышь). Опухолям позволяли расти в течение 19 дней до достижения среднего объема, составляющего приблизительно 50 мм^3. Мышей-носителей опухолей рандомизировали в группы (n=8 мышей на группу). Мыши-носители опухолей получали лечение либо контрольным антителом, либо антителом против TIGIT 313R19, либо антителом против TIGIT 313M32. Мышей дозировали 1 или 5 мг/кг каждые 5 дней. Проводили мониторинг роста опухоли и измеряли объемы опухолей электронным калипером в заданные моменты времени.

Подробное описание изобретения

В изобретении предложены новые агенты, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, полипептиды, антитела и гетеродимерные молекулы, которые модулируют иммунный ответ. Указанные агенты включают полипептиды, антитела и гетеродимерные молекулы, которые специфически связывают TIGIT, и агенты, которые модулируют активацию и/или сигнализацию TIGIT. Указанные агенты включают полипептиды, антитела и гетеродимерные молекулы, которые ингибируют активацию и/или сигнализацию TIGIT, усиливая таким образом иммунный ответ. Также предложены родственные полипептиды и полинуклеотиды, композиции, содержащие указанные агенты, и способы получения указанных агентов. Предложены способы скрининга для определения агентов, которые модулируют иммунный ответ. Предложены способы применения указанных новых агентов, например способы ингибирования роста опухоли и/или способы лечения рака. Также предложены способы лечения вирусных инфекций. Дополнительно предложены способы применения указанных новых агентов, например, способы активации иммунного ответа, способы стимуляции иммунного ответа, способы стимуляции иммунного ответа, способы повышения иммунного ответа, способы активации клеток-естественных киллеров (NK) и/или Т-клеток, способы повышения активности NK-клеток и/или Т-клеток, способы стимуляции активности NK-клеток и/или Т-клеток, способы снижения и/или ингибирования супрессорных Т-клеток, и/или способы снижения и/или ингибирования супрессорных клеток миелоидного происхождения. Кроме того, новые агенты, описанные в настоящем документе, могут применяться в способах ингибирования иммунного ответа, способах подавления иммунного ответа, способы снижения активности Т-клеток, и/или способы лечения аутоиммунных заболеваний.

I. Определения.

Для облегчения понимания настоящего изобретения ниже приведены определения некоторых терминов и выражений.

Термины "агонист" и "агонистический" в настоящем документе обозначают или описывают агент, способный прямо или непрямо по существу индуцировать биологическую активность, активировать биологическую активность, стимулировать биологическую активность, повышать или усиливать биологическую активность мишени и/или пути. Термин "агонист" в настоящем документе включает любой агент, который частично или полностью индуцирует активность белка, активирует белок, стимулирует активность белка, повышает или усиливает активность белка.

Термины "антагонист" и "антагонистический" в настоящем документе обозначают или описывают агент, способный прямо или непрямо, частично или полностью блокировать, ингибировать, снижать или нейтрализовать биологическую активность мишени и/или пути. Термин "антагонист" настоящем документе включает любой агент, который частично или полностью блокирует, ингибирует, снижает или нейтрализует активность белка.

Термины "модуляция" и "модулировать" в настоящем документе относятся к перемене или изменению биологической активности. Модуляция включает стимуляцию активности или ингибирование активности, однако не ограничивается ими. Модуляция может быть представлена повышением или снижением активности, изменению характеристик связывания или любому другому изменению биологических, функциональных или иммунологических свойств, ассоциированных с активностью белка, пути, системы или других представляющих интерес биологических мишеней.

Термин "антитело" в настоящем документе относится к молекуле иммуноглобулина, которая распознает и специфически связывает мишень за счет по меньшей мере одного антигенсвязывающего сайта. Указанная мишень может представлять собой белок, полипептид, пептид, углевод, полинуклеотид, липид или комбинация любого из вышеперечисленного. В настоящем документе термин охватывает интактные поликлональные антитела, интактные моноклональные антитела, фрагменты антитела (такие как Fab, Fab', $F(ab')_2$ и Fv-фрагменты), одноцепочечные Fv (scFv) антитела, мультиспецифические антитела, биспецифические антитела, моноспецифические антитела, моновалентные антитела, химерные антитела, гуманизированные антитела, антитела человека, слитые белки, содержащие антигенсвязывающий сайт антитела, и любую другую модифицированную молекулу иммуноглобулина, содержащую антигенсвязывающий сайт, при условии, что указанные антитела демонстрируют требуемую биологическую актив-

ность. Антитело может относиться к любому из пяти основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, или к их подклассам (изотипам) (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2), на основании их идентичности их константных доменов тяжелых цепей, называемых α, δ, ε, γ и μ, соответственно. Разные классы иммуноглобулинов содержат разные хорошо известные субъединичные структуры и трехмерные конфигурации. Антитела могут быть "свободными" или конъюгированными с другими молекулами, в том числе с токсинами и радиоизотопами, но не ограничиваясь ими.

Термин "фрагмент антитела" относится к части интактного антитела и, в целом, к определяющим антигены вариабельным областям интактного антитела. Примеры фрагментов антитела включают, не ограничиваясь перечисленными, Fab-, Fab'-, $F(ab')_2$- и Fv-фрагменты, линейные антитела, одноцепочечные антитела и мультиспецифические антитела, образованные фрагментами антитела. "Фрагмент антитела" в настоящем документе включает антигенсвязывающий сайт или эпитоп-сайт связывания.

Термин "вариабельная область" антитела относится к вариабельной области легкой цепи антитела или вариабельной области тяжелой цепи антитела, отдельно или в комбинации. В общем случае, вариабельная область тяжелой цепи или легкой цепи состоит из четырех каркасных областей, соединенных тремя определяющими комплементарность участками (CDR), также известными как "гипервариабельные участки". Области CDR каждой цепи удерживаются в непосредственной близости друг от друга каркасными областями, и совместно с участками CDR другой цепи вносят вклад в образование антигенсвязывающего(их) сайта (сайтов) антитела. Существует по меньшей мере две методики определения участков CDR: (1) подход, основанный на межвидовой вариабельности последовательностей (т.е. Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Edition, National Institutes of Health, Bethesda MD.), и (2) подход, основанный на кристаллографических исследованиях комплексов антиген-антитело (Al Lazikani et al., 1997, J. Mol. Biol., 273:927-948). Кроме того, в данной области техники для определения участков CDR иногда применяют комбинации указанных двух подходов.

Термин "моноклональное антитело" в настоящем документе относится к гомогенной популяций антител, вовлеченных в высокоспецифическое распознавание и связывание единственной антигенной детерминанты или эпитопа. В этом заключается отличие от поликлональных антител, которые, как правило, включают смесь разных антител, которые распознают разные антигенный детерминанты. Термин "моноклональное антитело" охватывает как интактные и полноразмерные моноклональные антитела, так и фрагменты антител (например, Fab-, Fab'-, $F(ab')_2$-, Fv-), одноцепочечные (scFv) антитела, слитые белки, содержащие фрагмент антитела, и любую другую модифицированную молекулу иммуноглобулина, содержащую антигенсвязывающий сайт. Кроме того, "моноклональное антитело" относится к таким антителам, полученным с применением любого числа техник, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, получения гибридом, фагового отбора, рекомбинантной экспрессии и трансгенных животных.

Термин "гуманизированное антитело" в настоящем документе относится к антителам, которые представляют собой специфические цепи иммуноглобулинов, химерные иммуноглобулины или их фрагменты, которые содержат минимальные не принадлежащие человеку последовательности. Как правило, гуманизированные антитела представляют собой иммуноглобулины человека, в которых остатки аминокислот из участков CDR заменены на остатки аминокислот из участков CDR вида, отличного от человека (например, мыши, крысы, кролика или хомяка), обладающие требуемой специфичностью, аффинностью и/или связывающим потенциалом. В некоторых случаях остатки аминокислот каркасной вариабельной области иммуноглобулина человека могут быть заменены на соответствующие остатки аминокислот в антителе не являющегося человеком вида. Указанное гуманизированное антитело может быть дополнительно модифицировано путем замены дополнительных остатков аминокислот в каркасной вариабельной области и/или в пределах замененных не являющихся человеком остатков аминокислот для дополнительной доработки и оптимизации специфичности, аффинности и/или связывающего потенциала антитела. Указанное гуманизированное антитело может содержать вариабельные домены, содержащие все или по существу все участки CDR, которые соответствуют не принадлежащему человеку иммуноглобулину, тогда как все или по существу все каркасные вариабельные области представлены областями последовательности иммуноглобулина человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанные вариабельные домены содержат каркасные области последовательности иммуноглобулина человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанные вариабельные домены содержат каркасные области консенсусной последовательности иммуноглобулина человека. Указанное гуманизированное антитело может также содержать по меньшей мере часть константной области или домена иммуноглобулина (Fc), как правило, иммуноглобулина человека.

Термин "антитело человека" в настоящем документе относится к антителу, продуцируемому человеком, или антителу, имеющему последовательность аминокислот, соответствующую антителу, продуцируемому человеком, полученному с применением любых известных в данной области техники техник.

Термин "химерное антитело" в настоящем документе относится к антителу, отличающемуся тем, что последовательность аминокислот молекулы иммуноглобулина происходит из двух или более видов. Как правило, вариабельные области легких и тяжелых цепей соответствуют вариабельным областям антитела, происходящим из одного вида млекопитающих (например, мыши, крысы, кролика и т.п.), с требуемой специфичностью, аффинностью и/или связывающим потенциалом, тогда как константные области гомоло-

гичны последовательности антитела, происходящего из другого вида. Константные области обычно представлены областями человека, чтобы избежать возникновения иммунного ответа на антитело.

Термины "эпитоп" и "антигенная детерминанта" используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к части антигена или мишени, которая может быть распознана и, в частности, связывающей конкретное антитело. Если антиген или мишень представляет собой полипептид, эпитопы могут быть образованы как непрерывной, так и не непрерывной последовательностью аминокислот, сближение которых обеспечивает третичная укладка белка. Эпитопы, образованные непрерывной последовательностью аминокислот (также называемые линейными эпитопами), как правило, сохраняются при денатурации белков, тогда как эпитопы, образованные за счет третичной укладки (также называемые конформационными эпитопами), как правило, утрачиваются при денатурации белков. Эпитоп, как правило, включает по меньшей мере 3, чаще по меньшей мере 5, 6, 7 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации.

Термины "селективно связывает" или "специфически связывает" означают, что агент взаимодействует с эпитопом, белком или целевой молекулой чаще, быстрее, дольше, с большей аффинностью, или с некоторой комбинацией перечисленных особенностей, чем с альтернативными веществами, в том числе с родственными и неродственными белками. Согласно определенным вариантам реализации "специфически связывает" означает, например, что агент связывает белок или мишень с K_D, составляющей приблизительно 0,1 мМ или менее, однако чаще составляющей менее чем приблизительно 1 мкМ. Согласно некоторым вариантам реализации "специфически связывает" означает, что агент связывает мишень с K_D, составляющей по меньшей мере приблизительно 0,1 мкМ или менее, по меньшей мере приблизительно 0,01 мкМ или менее, или по меньшей мере приблизительно 1 нМ или менее. Ввиду идентичности последовательностей гомологичных белков разных видов специфическое связывание может задействовать агент, который распознает белок или мишень более чем одного вида (например, TIGIT мыши и TIGIT человека). Аналогичным образом, ввиду наличия гомологии в определенных областях последовательностей полипептидов разных белков, специфическое связывание может задействовать агент, который распознает более чем один белок или мишень. Следует понимать, что согласно некоторым вариантам реализации агент, который специфически связывает первую мишень, может специфически связывать или не связывать вторую мишень. Соответственно, "специфическое связывание" не обязательно подразумевает (хотя может включать) эксклюзивное связывание, т.е. связывание с единственное мишенью. Соответственно, агент может, согласно некоторым вариантам реализации, специфически связывать более чем одну мишень. Согласно некоторым вариантам реализации может присутствовать несколько мишеней, которые связывает один и тот же антиген связывающий сайт на указанном агенте. Например, антитело в некоторых случаях может содержать два идентичных антигенсвязывающего сайта, каждый из которых специфически связывает тот же самый эпитоп на двух или более белках. Согласно некоторым другим альтернативным вариантам реализации антитело может быть биспецифическим и содержать по меньшей мере два антигенсвязывающего сайта, отличающихся разной специфичностью. Обычно, однако не обязательно, при упоминании связывания подразумевают специфическое связывание.

Термины "полипептид", "пептид" и "белок" используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к полимерам из аминокислот любой длины. Указанный полимер может быть линейным или разветвленным, может содержать модифицированные аминокислоты и может содержать прерывающие последовательность аминокислот компоненты, не являющиеся аминокислотами. Указанные термины также охватывают полимер аминокислот, который был модифицирован естественным путем или посредством вмешательства; например, в результате образования дисульфидной связи, гликозилирования, липидизации, ацетилирования, фосфорилирования или любой другой манипуляции или модификации, например, конъюгации с компонентом для мечения. Также в указанное определение включены, например, полипептиды, содержащие один или более аналогов аминокислоты (включая, например, отсутствующие в природе аминокислоты), а также другие модификации, известные в данной области техники. Следует понимать, что, поскольку полипептиды согласно настоящему изобретения могут быть основаны на антителах или других представителях суперсемейства иммуноглобулинов, согласно некоторым вариантам реализации "полипептид" может быть получен в одноцепочечном виде или в виде двух или более ассоциированных цепей.

Термины "полинуклеотид" и "нуклеиновая кислота" и "молекула нуклеиновой кислоты" используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к полимерам нуклеотидов любой длины, и включают ДНК и РНК. Указанные нуклеотиды могут представлять собой дезоксирибонуклеотиды, рибонуклеотиды, модифицированные нуклеотиды или основания, и/или их аналоги, или любой субстрат, который может быть включен в полимер с помощью ДНК- или РНК-полимеразы.

Термины "идентичный" или процент "идентичности" в контексте двух или более нуклеиновых кислот или полипептидов относятся к двум или более последовательностям или субпоследовательностям, которые являются одинаковыми или содержат заданный процент одинаковых нуклеотидов или остатков аминокислот при сравнении или выравнивании (с введением пропусков при необходимости) с максимальным соответствием, без учета каких-либо консервативных замен аминокислот, которые входят в определение идентичности последовательностей. Процент идентичности может быть измерен с приме-

нением программного обеспечения или алгоритмов для сравнения последовательностей, или путем визуального исследования. Различные алгоритмы и программное обеспечение, которые могут применяться для осуществления выравнивания последовательностей аминокислот или нуклеотидов, хорошо известны в данной области техники. Они включают, не ограничиваясь перечисленными, BLAST, ALIGN, Megalign, BestFit, GCG Wisconsin Package и их варианты. Согласно некоторым вариантам реализации две нуклеиновые кислоты или два полипептида согласно настоящему изобретению по существу являются идентичными, что означает, что они отличаются по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% и согласно некоторым вариантам реализации по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99% идентичностью нуклеотидов или остатков аминокислот, при сравнении и выравнивании с максимальным соответствием, по оценке с применением алгоритма сравнения последовательностей или путем визуального исследования. Согласно некоторым вариантам реализации идентичность наблюдается на протяжении области последовательностей, длина которой составляет по меньшей мере приблизительно 10, по меньшей мере приблизительно 20, по меньшей мере приблизительно 40-60 нуклеотидов или остатков аминокислот, по меньшей мере приблизительно 60-80 нуклеотидов или остатков аминокислот, или соответствует любому целочисленному значению между указанными значениями. Согласно некоторым вариантам реализации идентичность наблюдается на протяжении области, длина которой составляет более 60-80 нуклеотидов или остатков аминокислот, например, по меньшей мере приблизительно 80-100 нуклеотидов или остатков аминокислот, и согласно некоторым вариантам реализации указанные последовательности по существу идентичны на всем протяжении сравниваемых последовательностей, например, кодирующей области последовательности нуклеотидов.

"Консервативная замена аминокислоты" представляет собой замену, в результате которой один остаток аминокислоты заменяет другой остаток аминокислоты с аналогичной боковой цепью. В данной области техники в целом были охарактеризованы семейства остатков аминокислот с аналогичными боковыми цепями, в том числе 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), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), β-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Например, замена фенилаланином тирозина считается консервативной заменой. Обычно консервативные замены в последовательностях полипептидов и/или антител согласно настоящему изобретению не устраняют связывание полипептида или антитела, содержащего указанную последовательность аминокислот, с целевым сайтом связывания. Способы идентификации консервативных замен нуклеотидов и аминокислот, которые не элиминируют связывание, хорошо известны в данной области техники.

Термин "вектор" в настоящем документе означает конструкцию, которая способна доставлять и, как правило, экспрессировать один или более представляющих интерес генов или последовательностей в клетке-хозяине. Примеры векторов включают, не ограничиваясь перечисленными, вирусные векторы, экспрессионные векторы с депротеинизированной ДНК или РНК, плазмидные, космидные или фаговые векторы, экспрессионные ДНК- или РНК-векторы, ассоциированные с катионными конденсирующими агентами, и экспрессионные ДНК- или РНК-векторы, инкапсулированные в липосомы.

Полипептид, растворимый белок, антитело, полинуклеотид, вектор, клетка или композиция, который(ая) является "выделенным(ой)" представляет собой полипептид, растворимый белок, антитело, полинуклеотид, вектор, клетку или композицию, которая находится в форме, не обнаруживаемой в природе. Выделенные полипептиды, растворимые белки, антитела, полинуклеотиды, векторы, клетки или композиции включают полипептиды, растворимые белки, антитела, полинуклеотиды, векторы, клетки или композиции, которые были очищены до такой степени, что они более не находятся в форме, обнаруживаемой в природе. Согласно некоторым вариантам реализации полипептид, растворимый белок, антитело, полинуклеотид, вектор, клетка или композиция, который(ая) является выделенным(ой), является по существу чистым.

Термин "по существу чистый" в настоящем документе относится к по меньшей мере на 50% чистому (т.е. не содержащему загрязняющих примесей), по меньшей мере на 90% чистому, по меньшей мере на 95% чистому, по меньшей мере на 98% чистому или по меньшей мере на 99% чистому материалу.

Термин "иммунный ответ" в настоящем документе включает ответ со стороны как врожденной иммунной системы, так и адаптивной иммунной системы. Он включает и клеточноопосредованный и/или гуморальный иммунный ответ. Он включает, однако не ограничиваясь перечисленным, и Т-клеточный, и В-клеточный ответ, а также ответы, опосредованные другими клетками иммунной системы, такими как естественные клетки-киллеры (NK), моноциты, макрофаги и т.п.

Термины "рак" и "раковый" в настоящем документе относятся к физиологическому состоянию или описывают физиологическое состояние у млекопитающих, при котором популяция клеток характеризуется нерегулируемым ростом клеток. Примеры рака включают, не ограничиваясь перечисленными, карциному, бластому, саркому и раки крови, такие как лимфома и лейкоз.

Термины "опухоль" и "новообразование" в настоящем документе относятся к любой тканевой мас-

се, которая является результатом избыточного роста или пролиферации клеток, либо доброкачественной (нераковой), либо злокачественной (раковой), в том числе к предраковым поражениям.

Термин "метастазирование" в настоящем документе относится к процессу, за счет которого происходит распространение рака или его перенос из участка происхождения в другие области организма с развитием аналогичного ракового поражения в новой локализации. Обычно "метастатической" или "метастазирующей" клеткой называют клетку утрачивающую адгезивные контакты с соседними клетками и мигрирующую через кровоток или лимфу из первичного сайта заболевания во вторичные сайты по всему организму.

Термины "раковая стволовая клетка", "CSC", "опухолевая стволовая клетка" и "опухоль-инициирующая клетка" используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к клеткам рака или опухоли, которые: (1) обладают высокой пролиферативной способностью; (2) способны к асимметричному клеточному делению с образованием дифференцированных клеток-потомков одного или более типов, причем указанные дифференцированные клетки обладают сниженным пролиферативным или дифференцировочным потенциалом; и (3) способны к симметричному клеточному делению для самообновления или самообеспечения. Указанные свойства придают раковым стволовым клеткам способность к образованию или формированию опухоли или рака при последовательной трансплантации подходящему хозяину (например, мыши), в отличие от большинства опухолевых клеток, неспособных образовывать опухоли. Самообновление или дифференцировка раковых стволовых клеток происходит хаотическим образом, с образованием опухолей, содержащих аномальные типы клеток, которые могут со временем изменяться по мере возникновения мутаций.

Термины "раковая клетка" и "опухолевая клетка" относятся ко всей популяции клеток, происходящих из рака или опухоли, или предракового поражения, включая и нетуморогенные клетки, которые образуют основную часть популяции раковых клеток, и туморогенные стволовые клетки (раковые стволовые клетки). В настоящем документе термины "раковая клетка" или "опухолевая клетка" модифицированы термином "нетуморогенный" исключительно в случае описания клеток, неспособных к обновлению и дифференцировке, чтобы отличать указанные опухолевые клетки от раковых стволовых клеток.

Термин "туморогенный" в настоящем документе относится к функциональным признакам раковой стволовой клетки, в том числе к свойствам самообновления (в результате чего возникают дополнительные туморогенные раковые стволовые клетки) и пролиферации с образованием всех остальных опухолевых клеток (в результате чего возникают дифференцированные и, соответственно, нетуморогенные опухолевые клетки).

Термин "туморогенность" в настоящем документе относится к способности случайного образца клеток опухоли к образованию пальпируемых опухолей при последовательной трансплантации подходящим хозяевам (например, мышам).

Термин "субъект" относится к любому животному (например, млекопитающему), в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, к человеку, к не являющимся человеком приматам, к собачьим, кошачьим, кроликам, грызунам и т.п., которые служат в качестве реципиента конкретного лечения. Как правило, термины "субъект" и "пациент" используются в настоящем документе взаимозаменяемо в отношении субъекта-человека.

Термин "фармацевтически приемлемый" относится к веществу, которое одобрено или может быть одобрено контрольным органом федерального правительства или государственным правительством, или приведено в Фармакопее США или других общепризнанных фармакопеях, как подходящее для применения у животных, в том числе у человека.

Термины "фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, носитель или адъювант" или "приемлемый фармацевтический носитель" относятся к вспомогательному веществу, носителю или адъюванту, который может быть введен субъекту совместно по меньшей мере с одним агентом согласно настоящему описанию, не устраняющему фармакологическую активность последнего и нетоксичному при введении в дозах, достаточных для обеспечения терапевтического эффекта. В общем случае, согласно мнению специалистов в данной области техники и Управления по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными средствами США (FDA) фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, носитель или адъювант является неактивным ингредиентом любого состава.

Термины "эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество", или "терапевтический эффект" относятся к количеству описанного в настоящем документе агента, антитела, полипептида, полинуклеотида, малой органической молекулы или другого лекарственного средства, эффективного для "лечения" заболевания или расстройства у субъекта, например млекопитающего. В случае рака или опухоли терапевтически эффективное количество агента (например, полипептида или антитела) оказывает терапевтический эффект, и, таким образом, может усиливать или дополнительно стимулировать иммунный ответ, усиливать или дополнительно стимулировать противоопухолевый ответ, повышать цитолитическую активность иммунных клеток, повышать киллинг опухолевых клеток, повышать киллинг опухолевых клеток иммунными клетками, снижают число опухолевых клеток; уменьшают туморогенность, частоту туморогенности или туморогенный потенциал; снижают число или частоту встречаемости раковых стволовых клеток; снижают размер опухоли; снижают численность популяции раковых

клеток; ингибируют или останавливают инфильтрацию раковых клеток в периферические органы, включая, например, распространение рака в мягкие ткани и кости; ингибируют и останавливают метастазирование опухоли или раковых клеток; ингибируют и останавливают рост опухоли или раковых клеток; до некоторой степени облегчают один или более из симптомов, ассоциированных с раком; снижают заболеваемость и смертность; улучшают качество жизни; или обеспечивают комбинацию таких эффектов.

Термины "обработка", или "лечение", или "лечить"; или "смягчение", или "смягчать" относятся как к (1) терапевтическим мерам, обеспечивающим излечение, замедление, ослабление симптомов и/или остановку прогрессирования диагностированного патологического состояния или расстройства, так и к (2) профилактическим или предотвращающим мерам, которые предотвращают или замедляют развитие целевого патологического состояния или расстройства. Соответственно, нуждающиеся в лечении включают тех, у кого уже имеется указанное расстройство; подверженных указанному расстройству; и тех, у кого указанное расстройство требуется предотвратить. В случае рака или опухоли "лечение" субъекта в соответствии со способами согласно настоящему изобретению является успешным в том случае, если у указанного пациента наблюдается что-либо одно или более из следующего: повышенный иммунный ответ, повышенный противоопухолевый ответ, повышенная цитолитическая активность иммунных клеток, повышенный киллинг опухолевых клеток, повышенный киллинг опухолевых клеток иммунными клетками, снижение числа или полное отсутствие раковых клеток; уменьшение размера опухоли; ингибирование или отсутствие инфильтрации раковыми клетками периферических органов, в том числе распространение раковых клеток в мягкие ткани и кости; ингибирование или отсутствие метастазирования опухоли или раковых клеток; ингибирование или отсутствие роста рака; облегчение одного или более симптомов, ассоциированных с конкретным раком; сниженная заболеваемость и смертность; улучшение качества жизни; снижение туморогенности; снижение числа или частоты встречаемости раковых стволовых клеток; или некоторая комбинация эффектов.

В настоящем описании и формуле изобретения термины в единственном числе, в том числе в сочетании с определением "указанный(ая,ое)", включают соответствующие термины во множественном числе, если иное явным образом не следует из контекста.

Следует понимать, что в настоящем документе описание вариантов реализации с применением термина "содержащий" также включает в остальном аналогичные варианты реализации, описанные с применением терминов "состоящий из" и/или "состоящий по существу из". Следует также понимать, что в настоящем документе описание вариантов реализации с применением термина "состоящий по существу из" также включает в остальном аналогичные варианты реализации, описанные с применением термина "состоящий из".

В настоящем документе термин "приблизительно" или "примерно" в отношении величины или показателя включает (и описывает) варианты реализации, направленная на указанную величину или указанный показатель. Например, описание, относящееся к "приблизительно X", включает описание "X".

Термин "и/или" в таком выражении, как "A и/или B" в настоящем документе включает и A, и B; A или B; A (по отдельности); и B (по отдельности). Аналогичным образом, термин "и/или" в таком выражении, как "A, B и/или C" охватывает каждый из следующих вариантов реализации: A, B, и C; A, B, или C; A или C; A или B; B или C; A и C; A и B; B и C; A (по отдельности); B (по отдельности); и C (по отдельности).

II. Связывающие TIGIT агенты.

Т-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и ITIM (TIGIT) представляет собой трансмембранный гликопротеин I типа, который содержит вариабельный домен иммуноглобулина (IgV). TIGIT принадлежит к семейству рецепторов полиовируса (PVR) и связывается с рецептором полиовируса (PVR; CD155) с высокой аффинностью, и с PVRL-2 (CD112) и PVRL-3 (CD113) с меньшей аффинностью. TIGIT экспрессируется на Т-клетках, в том числе регуляторных Т-клетках и Т-клетках памяти, а также на NK-клетках, и после активации необученных CD4+ Т-клеток происходит его стимуляция. Полноразмерные последовательности аминокислот (АК) TIGIT мыши (UniProtKB No. P86176) и TIGIT человека (UniProtKB No. Q495A1) известны в данной области техники и представлены в настоящем документе как последовательности SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 4, соответственно. В настоящем документе при упоминании положений аминокислот используется нумерация, соответствующая полноразмерным последовательностям аминокислот, включая сигнальную последовательность.

В настоящем изобретении предложены агенты которые специфически связывают TIGIT. Указанные агенты называются в настоящем документе "связывающими TIGIT агентами". Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой антитело. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой полипептид. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент связывает TIGIT мыши. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент связывает TIGIT человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент связывает TIGIT мыши и TIGIT человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент связывает TIGIT человека и не связывает TIGIT мыши.

Согласно некоторым вариантам реализации агент связывает TIGIT и вмешивается во взаимодейст-

вие TIGIT со вторым белком. Согласно некоторым вариантам реализации агент связывает TIGIT и вмешивается во взаимодействие TIGIT с PVR. Согласно некоторым вариантам реализации агент связывает TIGIT и вмешивается во взаимодействие TIGIT с PVRL-2. Согласно некоторым вариантам реализации агент связывает TIGIT и вмешивается во взаимодействие TIGIT с PVRL-3. Согласно некоторым вариантам реализации агент специфически связывает TIGIT, и указанный агент нарушает связывание TIGIT с PVR, и/или нарушает PVR-активацию сигнализации TIGIT.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой антитело, специфически связывающее внеклеточный домен TIGIT, или его фрагмент. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой антитело, специфически связывающее внеклеточный домен TIGIT мыши, или его фрагмент. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой антитело, специфически связывающее внеклеточный домен TIGIT человека, или его фрагмент. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой антитело, специфически связывающее внеклеточный домен TIGIT мыши и TIGIT человека, или его фрагмент. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой антитело, специфически связывающее Ig-подобный домен TIGIT. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой антитело, специфически связывающее домен IgV TIGIT. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой антитело, связывание которого происходит в пределах аминокислот 22-141 TIGIT человека и/или аминокислот 29-148 TIGIT мыши. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой антитело, связывание которого происходит в пределах аминокислот 22-141 последовательности SEQ ID NO: 4 и/или аминокислот 29-148 последовательности SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым вариантам реализации связывание указанного агента происходит в пределах аминокислот 22-124 TIGIT человека и/или аминокислот 29-127 TIGIT мыши. Согласно некоторым вариантам реализации связывание указанного агента происходит в пределах аминокислот 22-124 последовательности SEQ ID NO: 4 и/или аминокислот 29-127 последовательности SEQ ID NO: 1. Согласно некоторым вариантам реализации связывание указанного связывающего TIGIT агента происходит в пределах SEQ ID NO: 3 или ее фрагмента. Согласно некоторым вариантам реализации связывание указанного связывающего TIGIT агента происходит в пределах SEQ ID NO: 6 или ее фрагмента. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой антитело, связывание которого происходит в пределах аминокислот 22-141 TIGIT человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой антитело, связывание которого происходит в пределах аминокислот 22-141 последовательности SEQ ID NO: 4. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой антитело, связывание которого происходит в пределах аминокислот 50-124 TIGIT человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой антитело, связывание которого происходит в пределах аминокислот 50-124 последовательности SEQ ID NO: 4. Согласно некоторым вариантам реализации связывание указанного связывающего TIGIT агента происходит в пределах SEQ ID NO: 6 или его фрагмента.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой антитело, которое связывает эпитоп, содержащий аминокислоты, входящие в состав последовательности SEQ ID NO: 79. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой антитело, которое связывает эпитоп, содержащий аминокислоты, входящие в состав последовательности SEQ ID NO: 80. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой антитело, которое связывает эпитоп, содержащий аминокислоты, входящие в состав последовательностей SEQ ID NO: 79 и SEQ ID NO: 80. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой антитело, которое связывает эпитоп, содержащий аминокислоты Q62 и I109 последовательности SEQ ID NO: 4. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой антитело, которое связывает эпитоп, содержащий аминокислоты Q62 и T119 последовательности SEQ ID NO: 4. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой антитело, которое связывает эпитоп, содержащий аминокислоты Q64 и I109 последовательности SEQ ID NO: 4. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой антитело, которое связывает эпитоп, содержащий аминокислоты Q64 и T119 последовательности SEQ ID NO: 4. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой антитело, которое связывает эпитоп, содержащий аминокислоты Q62, Q64 и I109 последовательности SEQ ID NO: 4. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой антитело, которое связывает эпитоп, содержащий аминокислоты Q62, Q64 и T119 последовательности SEQ ID NO: 4. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой антитело, которое связывает эпитоп, содержащий аминокислоты Q62, I109 и T119 последовательности SEQ ID NO: 4. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой антитело, которое связывает эпитоп, содержащий аминокисло-

ты Q64, I109 и T119 последовательности SEQ ID NO: 4. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой антитело, которое связывает эпитоп, содержащий аминокислоты Q62, Q64, I109 и T119 последовательности SEQ ID NO: 4. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой антитело, которое связывает эпитоп, содержащий по меньшей мере одну аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из: N58, E60, Q62, Q64, L65, F107, I109, H111, T117, T119, G120 и R121 последовательности SEQ ID NO: 4. Согласно некоторым вариантам реализации указанный эпитоп представляет собой конформационный эпитоп. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой антитело, которое связывает эпитоп, который не содержит аминокислоту V100 последовательности SEQ ID NO: 4.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент (например, антитело) связывает TIGIT с константой диссоциации (K_D), составляющей приблизительно 1 мкМ или менее, приблизительно 100 нМ или менее, приблизительно 40 нМ или менее, приблизительно 20 нМ или менее, приблизительно 10 нМ или менее, приблизительно 1 нМ или менее, приблизительно 0,1 нМ или менее, 50 пМ или менее, 10 пМ или менее или 1 пМ или менее. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент связывает TIGIT с K_D, составляющей приблизительно 20 нМ или менее. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент связывает TIGIT с K_D, составляющей приблизительно 10 нМ или менее. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент связывает TIGIT с K_D, составляющей приблизительно 1 нМ или менее. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент связывает TIGIT с K_D, составляющей приблизительно 0,5 нМ или менее. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент связывает TIGIT с K_D, составляющей приблизительно 0,1 нМ или менее. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент связывает TIGIT с K_D, составляющей приблизительно 50 пМ или менее. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент связывает TIGIT с K_D, составляющей приблизительно 25 пМ или менее. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент связывает TIGIT с K_D, составляющей приблизительно 10 пМ или менее. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент связывает TIGIT с K_D, составляющей приблизительно 1 пМ или менее. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент связывает как TIGIT человека и TIGIT мыши с K_D, составляющей приблизительно 10 нМ или менее. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент связывает как TIGIT человека и TIGIT мыши с K_D, составляющей приблизительно 1 нМ или менее. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент связывает как TIGIT человека, так и TIGIT мыши с K_D, составляющей приблизительно 0,1 нМ или менее. Согласно некоторым вариантам реализации указанная константа диссоциации связывающего агента (например, антитела) с TIGIT представляет собой константу диссоциации, определяемую с применением слитого белка TIGIT, содержащего по меньшей мере часть внеклеточного домена белка TIGIT, иммобилизированного на чипе Biacore. Согласно некоторым вариантам реализации указанная константа диссоциации связывающего агента (например, антитела) с TIGIT представляет собой константу диссоциации, определяемую с применением связывающего агента, захваченного антителом против IgG человека на чипе Biacore, и растворимого белка TIGIT.

Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент содержит первый антигенсвязывающий сайт, который специфически связывает TIGIT, и второй антигенсвязывающий сайт, который специфически связывает вторую мишень. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифический агент, который содержит первый антигенсвязывающий сайт, который специфически связывает TIGIT, и второй антигенсвязывающий сайт, который специфически связывает вторую мишень. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент связывает как TIGIT, так и вторую мишень с K_D, составляющей приблизительно 100 нМ или менее. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент связывает как TIGIT, так и вторую мишень с K_D, составляющей приблизительно 50 нМ или менее. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент связывает как TIGIT, так и вторую мишень с K_D, составляющей приблизительно 20 нМ или менее. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент связывает как TIGIT, так и вторую мишень с K_D, составляющей приблизительно 10 нМ или менее. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент связывает как TIGIT, так и вторую мишень с K_D, составляющей приблизительно 1 нМ или менее. Согласно некоторым вариантам реализации аффинность одного из антигенсвязывающих сайтов может быть слабее аффинности другого антигенсвязывающего сайта. Например, K_D одного антигенсвязывающего сайта может составлять приблизительно 1 нМ, а K_D второго антигенсвязывающего сайта может составлять приблизительно 10 нМ. Согласно некоторым вариантам реализации указанная разница в аффинности между двумя антигенсвязывающими сайтами может быть приблизительно 2-кратной или более, приблизительно 3-кратной или более, приблизительно 5-кратной или более, приблизительно 8-кратной или более, приблизительно 10-кратной или более, приблизительно 15-кратной или более, приблизительно 20-кратной или более, приблизительно 30-кратной или более, приблизительно 50-кратной или более, или приблизительно 100-кратной или более. Модуляция аффинностей двух антигенсвязывающих сайтов может влиять на биологическую активность биспецифического антитела. Например, уменьшение аффинности антиген связы-

вающего сайта TIGIT или второй мишени может оказывать требуемый эффект, например уменьшение токсичности связывающего агента и/или увеличенный терапевтический индекс.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент (например, антитело) связывает TIGIT с полумаксимальной эффективной концентрацией (EC_{50}), составляющей приблизительно 1 мкМ или менее, приблизительно 100 нМ или менее, приблизительно 40 нМ или менее, приблизительно 20 нМ или менее, приблизительно 10 нМ или менее, приблизительно 1 нМ или менее; или приблизительно 0,1 нМ или менее. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент связывается с TIGIT человека с полумаксимальной эффективной концентрацией (EC_{50}), составляющей приблизительно 1 мкМ или менее, приблизительно 100 нМ или менее, приблизительно 40 нМ или менее, приблизительно 20 нМ или менее, приблизительно 10 нМ или менее, приблизительно 1 нМ или менее; или приблизительно 0,1 нМ или менее. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент связывает TIGIT мыши и/или TIGIT человека с EC_{50}, составляющей приблизительно 40 нМ или менее, приблизительно 20 нМ или менее, приблизительно 10 нМ или менее, приблизительно 1 нМ или менее, или приблизительно 0,1 нМ или менее.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой антитело. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело представляет собой рекомбинантное антитело. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело представляет собой моноклональное антитело. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело представляет собой химерное антитело. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело представляет собой гуманизированное антитело. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело представляет собой антитело человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело представляет собой антитело IgA, IgD, IgE, IgG или IgM. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело представляет собой антитело IgG1. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело представляет собой антитело IgG2. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело представляет собой антитело IgG4. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело представляет собой фрагмент антитела, содержащий антигенсвязывающий сайт. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело представляет собой биспецифическое антитело или мультиспецифическое антитело. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело представляет собой моновалентное антитело. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело представляет собой моноспецифическое антитело. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело представляет собой бивалентное антитело. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело конъюгировано с цитотоксическим фрагментом. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело является выделенным. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело является по существу чистым.

Согласно некоторым вариантам реализации указанные связывающие TIGIT агенты представляют собой поликлональные антитела. Поликлональные антитела могут быть получены любым известным способом. Согласно некоторым вариантам реализации поликлональные антитела получают путем иммунизации животного (например, кролика, крысы, мыши, козы, осла) представляющим интерес антигеном (например, очищенным пептидным фрагментом, полноразмерным рекомбинантным белком или слитым белком) посредством нескольких подкожных или внутрибрюшинных инъекций. Указанный антиген может быть необязательно конъюгирован с носителем, таким как гемоцианин фиссуреллы (KLH) или сывороточный альбумин. Указанный антиген (с белком-носителем или без белка-носителя) разводят в стерильном солевом растворе и, как правило, комбинируют с адъювантом (например, полным или неполным адъювантом Фрейнда) для образования стабильной эмульсии. По истечении достаточного периода времени поликлональные антитела выделяют из организма иммунизированного животного, как правило, из крови или асцита. Указанные поликлональные антитела могут быть очищены из сыворотки или асцита в соответствии со стандартными для данной области техники способами, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, аффинной хроматографии, ионообменной хроматографии, гель-электрофореза и диализа.

Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент представляет собой моноклональное антитело. Моноклональные антитела могут быть получены с применением гибридомных способов, известных специалисту в данной области техники. Согласно некоторым вариантам реализации с применением гибридомного способа мышь, крысу, кролика, хомяка или другое подходящее животное-хозяина иммунизируют согласно описанию выше для обеспечения продуцирования антител, которые специфически связывают используемый для иммунизации антиген. Согласно некоторым вариантам реализации лимфоциты могут быть иммунизированы in vitro. Согласно некоторым вариантам реализации указанный используемый для иммунизации антиген может представлять собой белок человека или его фрагмент. Согласно некоторым вариантам реализации указанный используемый для иммунизации антиген может представлять собой белок мыши или его фрагмент.

После иммунизации лимфоциты выделяют и сливают с клетками подходящей линии клеток миеломы с применением, например, полиэтиленгликоля. Гибридомные клетки выбирают с применением специализированных сред, известных в данной области техники; неслитые лимфоциты и клетки миеломы не

выживают в процессе выбора. Гибридомы, которые продуцируют специфические моноклональные антитела, направленные против выбранного антигена, могут быть идентифицированы различными способами, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, с помощью иммунопреципитации, иммуноблоттинга и проведения анализов связывания in vitro (например, проточной цитометрии, FACS, ИФА ELISA и радиоиммунологического анализа). Указанные гибридомы могут быть размножены либо в культуре in vitro с применением стандартных способов, либо in vivo в виде асцитных опухолей в организме животного. Указанные моноклональные антитела могут быть очищены из культуральной среды или асцитной жидкости в соответствии со стандартными для данной области техники способами, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, аффинной хроматографии, ионообменной хроматографии, гель-электрофореза и диализа.

Согласно некоторым вариантам реализации моноклональные антитела могут быть получены с применением техник рекомбинантной ДНК, как известно специалисту в данной области техники. Полинуклеотиды, кодирующие моноклональное антитело, выделяют из зрелых В-клеток или гибридомных клеток, например, посредством ОТ-ПЦР с применением олигонуклеотидных праймеров, специфически амплифицирующих гены, кодирующие тяжелые и легкие цепи антитела, и определяют их последовательность с применением стандартных техник. Выделенные полинуклеотиды, кодирующие тяжелые и легкие цепи, затем клонируют в подходящие экспрессионные векторы, который продуцируют моноклональные антитела после трансфицирования ими клеток-хозяев, таких как E.coli, клетки COS обезьян, клетки яичника китайского хомячка (CHO) или клетки миеломы, в иных обстоятельствах не продуцирующих белки иммуноглобулинов.

Согласно некоторым другим вариантам реализации рекомбинантные моноклональные антитела или их фрагменты могут быть выделены из библиотек фагового дисплея, экспрессирующих вариабельные домены или CDR требуемого вида.

Полинуклеотид(ы), кодирующий(ие) моноклональное антитело, может(гут) быть модифицирован(ы), например, путем применения технологии рекомбинантной ДНК для получения альтернативных антител. Согласно некоторым вариантам реализации константные домены легкой цепи и тяжелой цепи, например, моноклонального антитела мыши могут быть заменены на константные области, например антитела человека для получения химерного антитело, или на неиммуноглобулиновый полипептид для получения слитого антитела. Согласно некоторым вариантам реализации указанные константные области усечены или удалены для получения требуемого фрагмента моноклонального антитела. Сайт-направленный мутагенез или мутагенез высокой плотности вариабельной(ых) области(тей) может применяться для оптимизации специфичности, аффинности и т.п. моноклонального антитела.

Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент представляет собой гуманизированное антитело. Как правило, гуманизированные антитела представляют собой иммуноглобулины человека, в которых остатки аминокислот из участков CDR заменены на остатки аминокислот из участков CDR не являющегося человеком вида (например, мыши, крысы, кролика, хомяка и т.п.), отличающимися требуемой специфичностью, аффинностью и/или связывающей способностью, с применением способов, известных специалисту в данной области техники. Согласно некоторым вариантам реализации некоторые из остатков аминокислот каркасной вариабельной области иммуноглобулина человека заменены на соответствующие остатки аминокислот в антителе не являющегося человеком вида. Согласно некоторым вариантам реализации гуманизированное антитело может быть дополнительно модифицировано путем замены дополнительных остатков или в каркасной вариабельной области, и/или в составе замененных не принадлежащих человеку остатков для дополнительной доработки и оптимизации специфичности, аффинности и/или потенциала антитела. В общем случае, гуманизированное антитело содержит области вариабельных доменов, содержащие все или по существу все участки CDR, которые соответствуют не принадлежащему человеку иммуноглобулину, а все или по существу все каркасные области относятся к последовательности иммуноглобулина человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанные каркасные области представляют собой каркасные области консенсусной последовательности иммуноглобулина человека. Согласно некоторым вариантам реализации гуманизированное антитело может также содержать по меньшей мере часть константной области или домена (Fc) иммуноглобулина, как правило, иммуноглобулина человека. Согласно некоторым вариантам реализации такие гуманизированные антитела применяют терапевтически поскольку они могут снижать антигенность и ответ HAMA (антитело человека против антитела мыши) при введении субъекту-человеку.

Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент представляет собой антитело человека. Антитела человека могут быть прямо получены с применением различных техник, известных в данной области техники. Согласно некоторым вариантам реализации антитела человека могут быть получены из иммортализованных В-лимфоцитов человека, иммунизированных in vitro, или из лимфоцитов, выделенных из организма иммунизированного индивидуума. В любом случае могут быть получены и выделены клетки, которые продуцируют антитело, направленное против целевого антигена. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело человека может быть выбрано из фаговой библиотеки, экспрессирующей антитела человека. Как вариант, для получения антител и фрагментов антител человека in vitro из репертуара генов вариабельных доменов иммуноглобулинов неиммунизированых

доноров может применяться технология фагового дисплея. Техники получения и применения фаговых библиотек антител хорошо известны в данной области техники. После идентификации антител для получения антител человека с большей аффинностью могут применяться стратегии аффинного созревания, известные в данной области техники, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, перестановка цепей и сайт-специфический мутагенез.

Согласно некоторым вариантам реализации антитела человека могут быть продуцированы в организме трансгенных мышей, у которых имеются иммуноглобулиновые локусы человека. После иммунизации указанные мыши способны продуцировать полный репертуар антител человека при отсутствии продуцирования эндогенных иммуноглобулинов.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело. Соответственно, настоящее изобретение охватывает биспецифические антитела, которые специфически распознают TIGIT и по меньшей мере одну дополнительную мишень. Биспецифические антитела способны специфически распознавать и связывать по меньшей мере два разных антигена или эпитопа. Указанные разные эпитопы могут располагаться либо в одной и той же молекуле (например, два эпитопа на TIGIT), либо на разных молекулах (например, один эпитоп располагается на TIGIT, а другой эпитоп - на другом белке). Согласно некоторым вариантам реализации биспецифическое антитело отличается усиленной активностью по сравнению с индивидуальным антителом или с комбинацией, включающей более одного антитела. Согласно некоторым вариантам реализации биспецифическое антитело отличается сниженной токсичностью по сравнению с индивидуальным антителом или с комбинацией, включающей более одного антитела. Специалистам в данной области техники известно, что любой терапевтический агент может отличаться уникальной фармакокинетикой (ФК) (например, временем полужизни в кровотоке). Согласно некоторым вариантам реализации биспецифическое антитело обладает способностью синхронизировать ФК двух активных связывающих агентов, при этом указанные два индивидуальных связывающих агента имеют разные профили ФК. Согласно некоторым вариантам реализации биспецифическое антитело обладает способностью фокусировать действие двух агентов в общей области (например, в опухоли и/или микроокружении опухоли). Согласно некоторым вариантам реализации биспецифическое антитело обладает способностью фокусировать действие двух агентов в направлении общей мишени (например, опухоли или опухолевой клетки). Согласно некоторым вариантам реализации биспецифическое антитело обладает способностью нацеливать действие двух агентов более чем на один биологический путь или более чем на одну биологическую функцию. Согласно некоторым вариантам реализации биспецифическое антитело обладает способностью к нацеливанию на две разные клетки и их сближению (например, иммунной клетки и опухолевой клетки).

Согласно некоторым вариантам реализации указанное биспецифическое антитело представляет собой моноклональное антитело. Согласно некоторым вариантам реализации указанное биспецифическое антитело представляет собой гуманизированное антитело. Согласно некоторым вариантам реализации указанное биспецифическое антитело представляет собой антитело человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанное биспецифическое антитело представляет собой антитело IgG1. Согласно некоторым вариантам реализации указанное биспецифическое антитело представляет собой антитело IgG2. Согласно некоторым вариантам реализации указанное биспецифическое антитело представляет собой антитело IgG4. Согласно некоторым вариантам реализации указанное биспецифическое антитело отличается уменьшенной токсичностью и/или уменьшенными побочными эффектами. Согласно некоторым вариантам реализации указанное биспецифическое антитело отличается уменьшенной токсичностью и/или уменьшенными побочными эффектами по сравнению со смесью двух индивидуальных антител или указанных антител в качестве единственных агентов. Согласно некоторым вариантам реализации указанное биспецифическое антитело отличается увеличенным терапевтическим индексом. Согласно некоторым вариантам реализации указанное биспецифическое антитело отличается увеличенным терапевтическим индексом по сравнению со смесью двух указанных индивидуальных антител или указанных антител в качестве единственных агентов.

Согласно некоторым вариантам реализации указанные антитела могут специфически распознавать и связывать первую антигенную мишень (например, TIGIT), а также вторую антигенную мишень, такую как эффекторная молекула на иммунной клетке (например, CD2, CD3, CD28, CTLA4, PD-1, PD-L1, CD80 или CD86) или Fc-рецептор (например, CD64, CD32 или CD16), для фокусирования механизмов клеточной защиты на клетке, экспрессирующей и/или продуцирующей первую антигенную мишень. Согласно некоторым вариантам реализации указанные антитела могут применяться для направления цитотоксических агентов на клетки, которые экспрессируют конкретный целевой антиген. Указанные антитела содержат антигенсвязывающее плечо и плечо, которое связывает цитотоксический агент или хелатор радионуклидов, такой как EOTUBE, DPTA, DOTA или TETA.

Техники получения биспецифических антител известны специалистам в данной области техники. Согласно некоторым вариантам реализации указанные биспецифические антитела содержат константные области тяжелых цепей с модификациями аминокислот, которые входят в состав поверхности раздела между двумя тяжелыми цепями. Согласно некоторым вариантам реализации указанные биспецифические антитела могут быть получены с применением стратегии "выступы-во-впадины". В некоторых слу-

чаях термины "выступы" и "впадины" заменяют на термины "возвышения" и "углубления". Согласно некоторым вариантам реализации указанные биспецифические антитела могут содержать варианты шарнирных областей, неспособные к образованию дисульфидных связей между тяжелыми цепями. Согласно некоторым вариантам реализации указанные модификации могут включать изменения аминокислот, которые обуславливают изменения электростатических взаимодействий. Согласно некоторым вариантам реализации указанные модификации могут включать изменения аминокислот, которые обуславливают изменения гидрофобных/гидрофильных взаимодействий.

Биспецифические антитела могут представлять собой интактные антитела или фрагменты антитела, содержащие антигенсвязывающие сайты. Также предусмотрены антитела более чем с двумя валентностями. Например, могут быть получены триспецифические антитела. Соответственно, согласно определенным вариантам реализации антитела против TIGIT являются мультиспецифическими.

Согласно некоторым вариантам реализации антитела (или другие полипептиды), описанные в настоящем документе, могут быть моноспецифическими. Согласно некоторым вариантам реализации каждый из одного или более антигенсвязывающих сайтов, которые содержит антитело, способен к связыванию (или связывает) гомологичный эпитоп на TIGIT.

Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент представляет собой фрагмент антитела. Фрагменты антитела могут иметь функции или способности, отличные от функций или способностей интактных антител; например, фрагменты антитела могут отличаться увеличенным проникновением в опухоль. Известны различные техники получения фрагментов антител, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, протеолитическое расщепление интактных антител. Согласно некоторым вариантам реализации фрагменты антитела включают $F(ab')_2$-фрагмент, получаемый путем расщепления молекулы антитела пепсином. Согласно некоторым вариантам реализации фрагменты антитела включают Fab-фрагмент, полученный путем восстановления дисульфидных мостиков $F(ab')_2$-фрагментов. Согласно другим вариантам реализации фрагменты антитела включают Fab-фрагмент, полученный путем обработки молекулы антитела папаином и восстанавливающим агентом. Согласно некоторым вариантам реализации фрагменты антитела получают с применением рекомбинантных способов. Согласно некоторым вариантам реализации фрагменты антитела включают Fv-фрагменты или одноцепочечные Fv-фрагменты (scFv). Fab-, Fv- и scFv-фрагменты антитела могут быть экспрессированы и секретированы в E.coli или других клетках-хозяевах, что обеспечивает получение значительных количеств указанных фрагментов. Согласно некоторым вариантам реализации фрагменты антитела выделяют из фаговых библиотек антител согласно описанию в настоящем документе. Например, могут применяться способы конструирования экспрессионных библиотек Fab, что обеспечивает быструю и эффективную идентификацию моноклональных Fab-фрагментов с требуемой специфичностью в отношении TIGIT, или их производных, фрагментов, аналогов или гомологов. Согласно некоторым вариантам реализации фрагменты антитела представляют собой линейные фрагменты антитела. Согласно некоторым вариантам реализации фрагменты антитела являются моноспецифическими или биспецифическими. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой scFv. Для получения одноцепочечных антител, специфических в отношении TIGIT могут применяться различные техники.

Согласно некоторым вариантам реализации, в частности в случае фрагментов антитела, антитело модифицируют для изменения (например, увеличения или уменьшения) времени его полужизни в сыворотке. Это может достигаться, например, путем включения эпитопа связывания рецептора реутилизации вот фрагмент антитела путем мутации подходящей области во фрагменте антитела или путем включения указанного эпитопа в пептидную метку, которую затем сливают с любым концом фрагмента антитела или с областью в середине фрагмента антитела (например, путем синтеза ДНК или пептидного синтеза).

Гетероконъюгатные антитела также включены в объем настоящего изобретения. Гетероконъюгатные антитела состоят из двух ковалентно соединенных антител. Такие антитела были предложены, например, для нацеливания иммунных клеток на нежелательные клетки. Также предусмотрена возможность получения гетероконъюгатных антител in vitro с применением известных в области химии синтеза белков способов, в том числе задействующих агенты для перекрестного связывания. Например, иммунотоксины могут быть сконструированы с применением реакции дисульфидного обмена или посредством образования тиоэфирной связи. Примеры подходящих для указанной цели реагентов включают иминотиолат и метил-4-меркаптобутиримидат.

Следует принять во внимание, что для целей настоящего изобретения модифицированные антитела могут содержать любой тип вариабельной области, который обеспечивает образование связи антитела с мишенью (т.е. TIGIT). В этом отношении вариабельная область может содержать вариабельную область или происходить из вариабельной области млекопитающего любого типа, у которого может быть индуцирован гуморальный ответ и продуцирование иммуноглобулинов против требуемого антигена. Соответственно, вариабельная область модифицированные антитела могут происходить, например, от человека, мыши, крысы, кролика, не являющегося человеком примата (например, яванского макака, других макак и т.п.) или кролика. Согласно некоторым вариантам реализации как вариабельные, так и константные области модифицированных иммуноглобулинов принадлежат человеку. Согласно другим вариантам реализации вариабельные области совместимых антител (обычно происходящие из источника, не яв-

ляющегося человеком) могут быть сконструированы или специфически индивидуализированы для улучшения связывающих свойств или снижения иммуногенности молекулы. Для этого вариабельные области, подходящие для применения согласно настоящему изобретению, могут быть гуманизированы или иным образом изменены посредством включения заимствованных последовательностей аминокислот.

Согласно некоторым вариантам реализации вариабельные домены как тяжелых, так и легких цепей изменяют путем по меньшей мере частичной замены одной или более участков CDR и, при необходимости, путем частичной замены каркасной области и модификации и/или изменения последовательностей. Хотя участки CDR могут происходить из антитела того же класса или даже подкласса, что и антитело, из которого происходят каркасные области. Предполагается, что участки CDR могут происходить из антитела другого класса и, часто, из антитела другого вида. Заменять все участки CDR всеми участками CDR донорной вариабельной области для переноса антигенсвязывающей способности одного вариабельного домена на другой может быть необязательно. Может быть необходимо только перенести остатки, необходимые для поддержания активности указанного антигенсвязывающего сайта.

Безотносительно изменений вариабельной области, специалистам в данной области техники будет понятно, что модифицированные антитела согласно настоящему изобретению включают антитела (например, полноразмерные антитела или их иммунореактивные фрагменты), в которых по меньшей мере часть одного или более доменов константной области была удалена или иным способом изменена для обеспечения требуемых биохимических характеристик, таких как усиление локализации в опухоли или увеличение времени полужизни в сыворотке по сравнению с антителом приблизительно с такой же иммуногенностью, содержащим природную или неизмененную константную область. Согласно некоторым вариантам реализации константная область модифицированных антител содержит константную область человека. Модификации константной области, совместимые с настоящим изобретением, включают добавления, делеции или замены одной или более аминокислот в одном или более доменах. Модифицированные антитела согласно описанию в настоящем документе могут включать изменения или модификации одного или более из трех константных доменов тяжелых цепей (CH1, CH2 или CH3) и/или константного домена легких цепей (CL). Согласно некоторым вариантам реализации один или более доменов частично или полностью удаляют из константных областей модифицированных антител. Согласно некоторым вариантам реализации указанные модифицированные антитела включают конструкции или варианты с удалениями доменов, отличающиеся тем, что CH2-домен удален полностью (конструкции ΔCH2). Согласно некоторым вариантам реализации указанный исключенный домен константной области заменяют на короткий аминокислотный спейсер (например, 10 остатков аминокислот), который обеспечивает некоторую молекулярную гибкость, обычно сообщаемую отсутствующей константной областью.

Согласно некоторым вариантам реализации модифицированные антитела конструируют путем слияния CH3-домена непосредственно с шарнирной областью антитела. Согласно другим вариантам реализации встраивают пептидный спейсер между шарнирной областью и модифицированными CH2- и/или CH3-доменами. Например, могут быть экспрессированы конструкции, в которых был удален CH2-домен, а оставшийся CH3-домен (модифицированный или немодифицированный) присоединен к шарнирной области спейсером длиной 5-20 аминокислот. Такой спейсер может быть добавлен для сохранения свободного положения регуляторных элементов константного домена и доступа к ним, или для сохранения гибкости шарнирной области. Однако следует отметить, что аминокислотные спейсеры могут в некоторых случаях оказываться иммуногенными и вызывать нежелательный иммунный ответ против указанной конструкции. Соответственно, согласно некоторым вариантам реализации любой добавленный в конструкцию спейсер должен быть относительно неиммуногенным для сохранения требуемых биологических характеристик модифицированных антител.

Согласно некоторым вариантам реализации в модифицированных антителах может только частично быть удален константный домен или осуществлена замена нескольких или единственной аминокислоты. Например, мутации единственной аминокислоты в выбранных областях домена CH2 может быть достаточно для снижения связывания Fc по существу. Согласно некоторым вариантам реализации мутации единственной аминокислоты в выбранных областях домена CH2 может быть достаточно для снижения связывания Fc по существу и усиления локализации в раковых клетках, и и/или проникновения в опухоль. Аналогичным образом, может быть желательно просто удалить часть одного или более доменов константной области, которые контролируют специфическую эффекторную функцию (например, связывание компонента комплемента C1q), которую предполагается модулировать. Такие частичные делеции в константных областях могут улучшать выбранные характеристики антитела (время полужизни в сыворотке) при сохранении других желательных функций, ассоциированных с интактным доменом константной области субъекта. Кроме того, как упоминалось выше, константные области раскрытых антител могут быть модифицированы посредством мутации или замены одной или более аминокислот, улучшающей профиль итоговой конструкции. При этом может быть возможным разрушение активности, обеспечиваемой консервативным сайтом связывания (например, связыванием Fc), при сохранении по существу конфигурации и иммуногенного профиля модифицированного антитела. Согласно некоторым вариантам реализации в константную область указанных модифицированных антител добавляют одну или более аминокислот для усиления требуемых характеристик, таких как уменьшение или увеличение эффектор-

ной функции или обеспечение большего числа сайтов присоединения цитотоксинов или углеводов.

В данной области техники известно, что константная область опосредует несколько эффекторных функций. Например, связывание компонента комплемента C1 с Fc-областью антител IgG или IgM (связанных с антигеном) активирует систему комплемента. Активация комплемента важна для опсонизации и лизиса клеточных патогенов. Активация комплемента также стимулирует воспалительный ответ и может также быть вовлечена в аутоиммунную гиперчувствительность. Кроме того, Fc-область антитела может связывать клетку, экспрессирующую Fc-рецептор (FcR). Существует ряд Fc-рецепторов, специфических для разных классов антител, в том числе IgG (γ-рецепторы), IgE (ε-рецепторы), IgA (α-рецепторы) и IgM (μ-рецепторы). Связывание антитела с Fc-рецепторами на поверхности клеток запускает ряд разнообразных важных биологических ответов, включая поглощение и разрушение покрытыми антителом частиц, клиренс иммунных комплексов, лизис покрытых антителами целевых клеток киллерными клетками (называемый антитело-зависимой клеточной цитотоксичностью, или АЗКЦ), высвобождение воспалительных медиаторов, плацентарный перенос и контроль продуцирования иммуноглобулина.

Согласно некоторым вариантам реализации указанные модифицированные антитела обеспечивают измененные эффекторные функции, что, в свою очередь, влияет на биологический профиль вводимого антитела. Например, согласно некоторым вариантам реализации делеция или инактивация (посредством точечных мутаций или других способов) домена константной области может снижать связывание Fc-рецептором циркулирующего модифицированного антитела. Согласно некоторым вариантам реализации делеция или инактивация (посредством точечных мутаций или других способов) домена константной области могут снижать Fc рецептор связывание циркулирующего модифицированного антитела, с усилением таким образом локализации в области раковых клеток и/или проникновения в опухоль. Согласно другим вариантам реализации указанные модификации константной области увеличивают время полужизни антитела в сыворотке. Согласно другим вариантам реализации указанные модификации константной области снижают время полужизни антитела в сыворотке. Согласно некоторым вариантам реализации константную область модифицируют таким образом, чтобы устранить дисульфидные связи или олигосахаридные фрагменты. Модификации константной области в соответствии с настоящим изобретением могут легко быть реализованы с применением хорошо известных биохимических техник или техник молекулярного конструирования.

Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент, который представляет собой антитело, не обладает одной или более из эффекторных функций. Например, согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело не обладает АЗКЦ-активностью и/или не обладает комплементзависимой цитотоксичностью (КЗЦ-активностью). Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело не связывает Fc-рецептор и/или факторы комплемента. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело не обладает эффекторной(ыми) функцией(ями).

Настоящее изобретение также охватывает варианты и эквиваленты, по существу гомологичные рекомбинантным, моноклональным, химерным, гуманизированным антителам и антителам человека, или их фрагментам с характеристиками антител, описанным в настоящем документе. Указанные варианты могут включать, например, мутации типа консервативных замен, т.е. замену одной или более аминокислоты аналогичными аминокислотами.

В настоящем изобретении предложены способы получения антитела, которое связывает TIGIT, в том числе биспецифических антител, которые специфически связывают как TIGIT, так и вторую мишень. Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ получения антитела, которое связывает TIGIT, включает применение гибридомных техник. Согласно некоторым вариантам реализации предложен способ получения антитела, которое связывает TIGIT человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ включает применение полипептида, содержащего внеклеточный домен TIGIT мыши или его фрагмент, в качестве антигена. Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ включает применение полипептида, содержащего внеклеточный домен TIGIT человека или его фрагмент, в качестве антигена. Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ включает применение полипептида, содержащего аминокислоты 29-148 TIGIT мыши, в качестве антигена. Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ включает применение полипептида, содержащего аминокислоты 22-141 TIGIT человека, в качестве антигена. Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ включает применение полипептида, содержащего аминокислоты 29-148 последовательности SEQ ID NO: 1, в качестве антигена. Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ включает применение полипептида, содержащего аминокислоты 22-141 последовательности SEQ ID NO: 4, в качестве антигена. Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ включает применение полипептида, содержащего SEQ ID NO: 3 или ее фрагмент, в качестве антигена. Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ включает применение полипептида, содержащего SEQ ID NO: 6 или ее фрагмент, в качестве антигена. Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ получения антитела, которое связывает TIGIT, включает скрининг фаговой библиотеки. Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ получения антитела, которое связывает TIGIT, включает скрининг фаговой библиотеки человека. Согласно настоящему изобретению также предло-

жены способы идентификации антитела, которое связывает TIGIT. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело идентифицируют посредством FACS-скрининга на наличие связывания с TIGIT или его фрагмент. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело идентифицируют посредством скрининга с применением ИФА ELISA на наличие связывания с TIGIT или его фрагментом. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело идентифицируют посредством FACS-скрининга на блокирование связывания TIGIT с PVR.

Согласно некоторым вариантам реализации способ получения антитела против TIGIT включает иммунизацию млекопитающего полипептидом, содержащим аминокислоты 29-148 TIGIT мыши. Согласно некоторым вариантам реализации способ получения антитела против TIGIT включает иммунизацию млекопитающего полипептидом, содержащим аминокислоты 22-141 TIGIT человека. Согласно некоторым вариантам реализации способ получения антитела против TIGIT включает иммунизацию млекопитающего полипептидом, содержащим фрагмент (например, часть) аминокислот 29-148 TIGIT мыши. Согласно некоторым вариантам реализации способ получения антитела против TIGIT включает иммунизацию млекопитающего полипептидом, содержащим фрагмент аминокислот 22-141 TIGIT человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ дополнительно включает выделение антител или антитело-продуцирующих клеток от млекопитающего. Согласно некоторым вариантам реализации способ получения моноклонального антитела, который связывает TIGIT, включает: (a) иммунизацию млекопитающего полипептидом, содержащим фрагмент аминокислот 29-148 TIGIT мыши; (b) выделение антитело-продуцирующих клеток от иммунизированного млекопитающего; и (c) слияние указанных антитело-продуцирующих клеток с клетками линии миеломы для получения гибридомных клеток. Согласно некоторым вариантам реализации способ получения моноклонального антитела, которое связывает TIGIT, включает: (a) иммунизацию млекопитающего полипептидом, содержащим фрагмент аминокислот 22-141 TIGIT человека; (b) выделение антитело-продуцирующих клеток от иммунизированного млекопитающего; и (c) слияние указанных антитело-продуцирующих клеток с клетками линии миеломы для получения гибридомных клеток. Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ дополнительно включает (d) выбор гибридомной клетки, экспрессирующей антитело, которое связывает TIGIT. Согласно некоторым вариантам реализации указанное млекопитающее представляет собой мышь. Согласно некоторым вариантам реализации указанное млекопитающее представляет собой крысу. Согласно некоторым вариантам реализации указанное млекопитающее представляет собой кролика. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело выбирают с применением полипептида, содержащего аминокислоты 29-148 или их фрагмент из TIGIT мыши. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело выбирают с применением полипептида, содержащего аминокислоты 22-141 или их фрагмент из TIGIT человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело связывает как TIGIT человека, так и TIGIT мыши. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело не связывает TIGIT мыши. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело не связывает TIGIT яванского макака. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело не связывает TIGIT макака-резуса. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело не связывает TIGIT крысы. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело связывает TIGIT человека и не связывает TIGIT мыши. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело связывает TIGIT человека и не связывает TIGIT яванского макака. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело связывает TIGIT человека и не связывает TIGIT макака-резуса. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело связывает TIGIT человека и не связывает TIGIT крысы.

Согласно некоторым вариантам реализации способ получения антитела, которое связывает TIGIT, включает идентификацию антитела с применением мембраносвязанной гетеродимерной молекулы, содержащей один антигенсвязывающий сайт. Согласно некоторым неограничивающим вариантам реализации указанное антитело идентифицируют с применением способов и полипептидов, описанных в международной публикации WO 2011/100566.

Согласно некоторым вариантам реализации способ получения антитела, которое связывает TIGIT, включает скрининг экспрессирующей антитела библиотеки. Согласно некоторым вариантам реализации указанная экспрессирующая антитела библиотека представляет собой фаговую библиотеку. Согласно некоторым вариантам реализации указанный скрининг включает пэннинг. Согласно некоторым вариантам реализации указанная экспрессирующая антитела библиотека представляет собой библиотеку клеток млекопитающего. Согласно некоторым вариантам реализации скрининг указанной экспрессирующей антитела библиотеки проводят с применением аминокислот 29-148 TIGIT мыши или их фрагмента. Согласно некоторым вариантам реализации скрининг указанной экспрессирующей антитела библиотеки проводят с применением аминокислот 22-141 TIGIT человека или его фрагмента. Согласно некоторым вариантам реализации указанное идентифицированное при скрининге антитело связывает как TIGIT человека, так и TIGIT мыши. Согласно некоторым вариантам реализации указанное идентифицированное при скрининге антитело представляет собой антагонист TIGIT.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело, полученное с применением способов, описанных в настоящем документе, представляет собой антагонист TIGIT. Согласно некоторым вариантам реализации антитело, полученное с применением способов, описанных в настоящем документе, ингиби-

рует сигнализацию TIGIT. Согласно некоторым вариантам реализации антитело, полученное с применением способов, описанных в настоящем документе, ингибирует фосфорилирование TIGIT.

Согласно некоторым вариантам реализации антитела, описанные в настоящем документе являются выделенными. Согласно некоторым вариантам реализации антитела, описанные в настоящем документе, являются по существу чистыми.

Связывающие TIGIT агенты (например, антитела) согласно настоящему изобретению могут быть проанализированы на наличие специфического связывания любым способом, известным в данной области техники. Иммунологические анализы, которые могут применяться, включают, не ограничиваясь перечисленными, системы конкурентного и неконкурентного анализа с применением таких техник, как анализ Biacore, FACS-анализ, иммунофлуоресценция, иммуноцитохимия, анализ методом вестерн-блоттинга, радиоиммунологический анализ, ИФА ELISA, иммунологический "сэндвич-анализ", анализ иммунопреципитации, реакция осаждения, реакция диффузной преципитации в геле, иммунодиффузионный анализ, анализ агглютинации, анализ фиксации комплемента, иммунорадиометрический анализ, флуоресцентный иммунологический анализ и иммунологический анализ с белком А. Такие анализы являются рутинными и хорошо известны в данной области техники (см., например, Ausubel et al., Editors, 1994-present, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York, NY).

Согласно неограничивающему примеру, скрининг на наличие специфического связывания антитела с TIGIT человека может быть проведен с применением ИФА ELISA. ИФА ELISA включает получение антигена (например, TIGIT или его фрагмента), нанесение антигена на лунки 96-луночного микротитрационного планшета, добавление тестируемых антител, конъюгированных с детектируемым соединением, таким как ферментативный субстрат (например, пероксидазой хрена или щелочной фосфатазой), в лунку, инкубирование в течение периода времени и детекцию присутствия антитела, связанного с указанным антигеном. Согласно некоторым вариантам реализации указанные тестируемые антитела не конъюгируют с детектируемым соединением, однако вместо этого в лунки добавляют вторичное антитело, которое распознает указанное антитело (например, антитело против Fc) и конъюгировано с детектируемым соединением. Согласно некоторым вариантам реализации вместо нанесения антигена на лунки могут быть нанесены тестируемые антитела, добавлен антиген (например, TIGIT), а затем вторичное антитело, конъюгированное с детектируемым соединением. Специалисту в данной области техники известны показатели, которые могут быть модифицированы для увеличения детектируемого сигнала; в данной области техники также известны другие варианты ИФА ELISA.

Согласно другому неограничивающему примеру специфическое связывание антитела с TIGIT может быть определено с применением FACS. Анализ с применением FACS-скрининга может включать получение конструкции кДНК, которая экспрессирует антиген, в виде полноразмерного белка (TIGIT) или слитого белка (например, TIGIT-CD4TM), трансфекция указанной конструкцией клеток, экспрессию указанного антигена на поверхности клеток, смешивание тестируемых антител с трансфицированными клетками и инкубирование на протяжении некоторого периода времени. Клетки, которые связывают тестируемые антитела, могут быть идентифицированы с применением вторичного антитела, конъюгированного с детектируемым соединением (например, ФЭ-конъюгированного антитела против Fc) и проточного цитометра. Специалисту в данной области техники известны показатели, которые могут быть модифицированы для оптимизации детектируемого сигнала, а также другие варианты FACS, которые могут улучшать скрининг (например, скрининг для выявления блокирующих антител).

Сродство (аффинность) к связыванию антитела или другого связывающего агента с антигеном (например, TIGIT), и скорость диссоциации взаимодействие антитела с антигеном могут быть определены с применением конкурентных анализов связывания. Один из примеров конкурентного анализа связывания представлен радиоиммунологический анализ, включающий инкубирование меченого антигена (например, ^{3}H или ^{125}I-TIGIT), или его фрагмента или варианта с представляющим интерес антителом в присутствии возрастающих количеств немеченого антигена с последующей детекцией антитела, связанного с меченым антигеном. Аффинность антитела в отношении антигена и скорости диссоциации связывания могут быть определены на основании данных, полученных путем анализа графика Скэтчарда. Согласно некоторым вариантам реализации для определения скоростей связывания и диссоциации антител или агентов, которые связывают антиген (например, TIGIT) применяют кинетический анализ Biacore. Согласно некоторым вариантам реализации кинетический анализ Biacore включает анализ связывания и диссоциации антител с чипами, на поверхности которых иммобилизирован антиген (например, TIGIT). Согласно некоторым вариантам реализации кинетический анализ Biacore включает анализ связывания и диссоциации антигена (например, TIGIT) с чипами, на поверхности которых иммобилизировано антитело (например, антитело против TIGIT).

Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложен связывающий TIGIT агент (например, антитело), который специфически связывает TIGIT, характеризующийся тем, что указанный связывающий TIGIT агент содержит одну, две, три, четыре, пять и/или шесть участков CDR антитела 313R11, 313R12, 313R14 или 313R19 (см. табл. 1). Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит одну или более из участков CDR 313R11, 313R12, 313R14 или 313R19 или их гуманизированных вариантов; два или более из участков CDR 313R11,

313R12, 313R14 или 313R19 или их гуманизированных вариантов; три или более из участков CDR 313R11, 313R12, 313R14 или 313R19 или их гуманизированных вариантов; четыре или более из участков CDR 313R11, 313R12, 313R14 или 313R19 или их гуманизированных вариантов; пять или более из участков CDR 313R11, 313R12, 313R14 или 313R19 или их гуманизированных вариантов; или все шесть участков CDR 313R11, 313R12, 313R14 или 313R19 или их гуманизированных вариантов.

Таблица 1

	313R11, 313R12	313R14, 313R19
CDR1 тяжелой цепи (HC CDR1)	GSSLSSSYMS (SEQ ID NO:7)	GFSLSSSYMS (SEQ ID NO:13)
HC CDR2	IIGSNGNTYYANWAKG (SEQ ID NO:8)	IIGSNGNTYYANWAKG (SEQ ID NO:8)
HC CDR3	GGYRTSGMDP (SEQ ID NO:9)	GGYRTSGMDP (SEQ ID NO:9)
CDR1 легкой цепи (LC CDR1)	QASQSISSYLNW (SEQ ID NO:10)	QASQSNIYSDLAW (SEQ ID NO:14) или QASQNIYSDLAW (SEQ ID NO:81)
LC CDR2	DALKLAS (SEQ ID NO:11)	RASTLAS (SEQ ID NO:15)
LC CDR3	QQEHSVGNVDN (SEQ ID NO:12)	QQEHLVAWIYN (SEQ ID NO:16)

Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложен связывающий TIGIT агент (например, антитело), который специфически связывает TIGIT, характеризующийся тем, что указанный связывающий TIGIT агент содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащий GSSLSSSYMS (SEQ ID NO: 7) или GFSLSSSYMS (SEQ ID NO: 13), CDR2 тяжелой цепи, содержащий IIGSNGNTYYANWAKG (SEQ ID NO: 8), и CDR3 тяжелой цепи, содержащий GGYRTSGMDP (SEQ ID NO: 9). Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент дополнительно содержит CDR1 легкой цепи, содержащий QASQSISSYLNW (SEQ ID NO: 10), QASQSNIYSDLAW (SEQ ID NO: 14) или QASQNIYSDLAW (SEQ ID NO: 81), CDR2 легкой цепи, содержащий DALKLAS (SEQ ID NO: 11) или RASTLAS (SEQ ID NO: 15), и CDR3 легкой цепи, содержащий QQEHSVGNVDN (SEQ ID NO: 12) или QQEHLVAWIYN (SEQ ID NO: 16). Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит CDR1 легкой цепи, содержащий QASQSISSYLNW (SEQ ID NO: 10), QASQSNIYSDLAW (SEQ ID NO: 14) или QASQNIYSDLAW (SEQ ID NO: 81), CDR2 легкой цепи, содержащий DALKLAS (SEQ ID NO: 11) или RASTLAS (SEQ ID NO: 15), и CDR3 легкой цепи, содержащий QQEHSVGNVDN (SEQ ID NO: 12) или QQEHLVAWIYN (SEQ ID NO: 16). Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит: (a) CDR1 тяжелой цепи, содержащий GSSLSSSYMS (SEQ ID NO: 7) или GFSLSSSYMS (SEQ ID NO: 13), CDR2 тяжелой цепи, содержащий IIGSNGNTYYANWAKG (SEQ ID NO: 8), и CDR3 тяжелой цепи, содержащий GGYRTSGMDP (SEQ ID NO: 9) и (b) CDR1 легкой цепи, содержащий QASQSISSYLNW (SEQ ID NO: 10), QASQSNIYSDLAW (SEQ ID NO: 14) или QASQNIYSDLAW (SEQ ID NO: 81), CDR2 легкой цепи, содержащий DALKLAS (SEQ ID NO: 11) или RASTLAS (SEQ ID NO: 15), и CDR3 легкой цепи, содержащий QQEHSVGNVDN (SEQ ID NO: 12) или QQEHLVAWIYN (SEQ ID NO: 16). Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит: (a) CDR1 тяжелой цепи, содержащий GSSLSSSYMS (SEQ ID NO: 7), CDR2 тяжелой цепи, содержащий IIGSNGNTYYANWAKG (SEQ ID NO: 8), и CDR3 тяжелой цепи, содержащий GGYRTSGMDP (SEQ ID NO: 9) и (b) CDR1 легкой цепи, содержащий QASQSISSYLNW (SEQ ID NO: 10), CDR2 легкой цепи, содержащий DALKLAS (SEQ ID NO: 11), и CDR3 легкой цепи, содержащий QQEHSVGNVDN (SEQ ID NO: 12). Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит: (a) CDR1 тяжелой цепи, содержащий GFSLSSSYMS (SEQ ID NO: 13), CDR2 тяжелой цепи, содержащий IIGSNGNTYYANWAKG (SEQ ID NO: 8), и CDR3 тяжелой цепи, содержащий GGYRTSGMDP (SEQ ID NO: 9) и (b) CDR1 легкой цепи, содержащий QASQSNIYSDLAW (SEQ ID NO: 14), CDR2 легкой цепи, содержащий RASTLAS (SEQ ID NO: 15), и CDR3 легкой цепи, содержащий QQEHLVAWIYN (SEQ ID NO: 16). Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит: (a) CDR1 тяжелой цепи, содержащий GFSLSSSYMS (SEQ ID NO: 13), CDR2 тяжелой цепи, содержащий IIGSNGNTYYANWAKG (SEQ ID NO: 8), и CDR3 тяжелой цепи, содержащий GGYRTSGMDP (SEQ ID NO: 9) и (b) CDR1 легкой цепи, содержащий QASQNIYSDLAW

(SEQ ID NO: 81), CDR2 легкой цепи, содержащий RASTLAS (SEQ ID NO: 15), и CDR3 легкой цепи, содержащий QQEHLVAWIYN (SEQ ID NO: 16).

Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложен связывающий TIGIT агент (например, антитело), который специфически связывает TIGIT человека, характеризующийся тем, что указанный связывающий TIGIT агент содержит: (a) CDR1 тяжелой цепи, содержащий GSSLSSSYMS (SEQ ID NO: 7), GFSLSSSYMS (SEQ ID NO: 13), или ее вариант, содержащий 1, 2, 3 или 4 замены аминокислот; (b) CDR2 тяжелой цепи, содержащий IIGSNGNTYYANWAKG (SEQ ID NO: 8), или ее вариант, содержащий 1, 2, 3 или 4 замены аминокислот; (c) CDR3 тяжелой цепи, содержащий GGYRTSGMDP (SEQ ID NO: 9), или ее вариант, содержащий 1, 2, 3 или 4 замены аминокислот; (d) CDR1 легкой цепи, содержащий QASQSISSYLNW (SEQ ID NO: 10), QASQSNIYSDLAW (SEQ ID NO: 14), QASQNIYSDLAW (SEQ ID NO: 81), или ее вариант, содержащий 1, 2, 3 или 4 замены аминокислот; (e) CDR2 легкой цепи, содержащий DALKLAS (SEQ ID NO: 11), RASTLAS (SEQ ID NO: 15), или ее вариант, содержащий 1, 2, 3 или 4 замены аминокислот; и (f) CDR3 легкой цепи, содержащий QQEHSVGNVDN (SEQ ID NO: 12), QQEHLVAWIYN (SEQ ID NO: 16), или ее вариант, содержащий 1, 2, 3 или 4 замены аминокислот. Согласно некоторым вариантам реализации указанные замены аминокислот представляют собой консервативные замены. Согласно некоторым вариантам реализации указанные замены вносят в рамках процесса гуманизации. Согласно некоторым вариантам реализации указанные замены вносят в рамках процесса гуманизации зародышевой линии.

Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложен связывающий TIGIT агент (например, антитело), который специфически связывает TIGIT, характеризующийся тем, что указанный связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи, отличающуюся по меньшей мере приблизительно 80% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO: 32, и/или вариабельную область легкой цепи, отличающуюся по меньшей мере 80% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 20. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи, отличающуюся по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 97% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 17. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи, отличающуюся по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 97% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 19. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи, отличающуюся по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 97% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 32. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область легкой цепи, отличающуюся по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 97% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 18. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область легкой цепи, отличающуюся по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 97% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 20. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи, отличающуюся по меньшей мере приблизительно 95% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO: 32, и/или вариабельную область легкой цепи, отличающуюся по меньшей мере приблизительно 95% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 20. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO: 32, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 20. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO: 32, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 20. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи, по существу состоящую из последовательности SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO: 32, и вариабельную область легкой цепи, по существу состоящую из последовательности SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 20. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO: 32, и вариабельную область легкой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 20.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 17, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 18. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT

агент состоит из вариабельной области тяжелой цепи, по существу состоящей из последовательности SEQ ID NO: 17, и вариабельной области легкой цепи, по существу состоящей из последовательности SEQ ID NO: 18. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 17, и вариабельную область легкой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 18.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 19, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 20. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи, по существу состоящую из последовательности SEQ ID NO: 19, и вариабельную область легкой цепи, по существу состоящую из последовательности SEQ ID NO: 20. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 19, и вариабельную область легкой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 20.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 32, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 20. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи, по существу состоящую из последовательности SEQ ID NO: 32, и вариабельную область легкой цепи, по существу состоящую из последовательности SEQ ID NO: 20. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 32, и вариабельную область легкой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 20.

Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложен связывающий TIGIT агент (например, антитело), который специфически связывает TIGIT, характеризующийся тем, что указанный связывающий TIGIT агент содержит: (a) тяжелую цепь, отличающуюся по меньшей мере 90% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 34 или SEQ ID NO: 56; и/или (b) легкую цепь, отличающуюся по меньшей мере 90% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 28 или SEQ ID NO: 30. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит: (a) тяжелую цепь, отличающуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 34 или SEQ ID NO: 56; и/или (b) легкую цепь, отличающуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 28 или SEQ ID NO: 30. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 26, и/или легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 28. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 27, и/или легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 28. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 29, и/или легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 30. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 34, и/или легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 30. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 56, и/или легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 30. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит тяжелую цепь, состоящую по существу из последовательности SEQ ID NO: 26 или SEQ ID NO: 27, и легкую цепь, состоящую по существу из последовательности SEQ ID NO: 28. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит тяжелую цепь, состоящую по существу из последовательности SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 34 или SEQ ID NO: 56, и легкую цепь, состоящую по существу из последовательности SEQ ID NO: 30. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит тяжелую цепь, состоящую из SEQ ID NO: 26, и легкую цепь, состоящую из SEQ ID NO: 28. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит тяжелую цепь, состоящую из SEQ ID NO: 27, и легкую цепь, состоящую из SEQ ID NO: 28. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит тяжелую цепь, состоящую из SEQ ID NO: 29, и легкую цепь, состоящую из SEQ ID NO: 30. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит тяжелую цепь, состоящую из SEQ ID NO: 34, и легкую цепь, состоящую из SEQ ID NO: 30. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит тяжелую цепь, состоящую из SEQ ID NO: 56, и легкую цепь, состоящую из SEQ ID NO: 30.

Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи антитела 313R11. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит вариабельные области антитела 313R11, при этом указанные вариабельная область тяжелой цепи и/или вариабельная область легкой цепи из антитела 313R11 прошли аффинное созревание. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент содержит тяжелую цепь и легкую цепь антитела 313R11 (с лидерной последовательностью или без лидерной последовательности). Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент представляет собой антитело 313R11. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий

TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи и/или вариабельную область легкой цепи антитела 313R11, при этом указанные вариабельная область тяжелой цепи и/или вариабельная область легкой цепи были гуманизированы. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи и/или вариабельную область легкой цепи антитела 313R11 в гуманизированной форме. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи антитела 313R11 в виде части тяжелой цепи IgG1, IgG2 или IgG4.

Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент содержит, состоит по существу или состоит из антитела 313R11. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент содержит, состоит по существу или состоит из варианта антитела 313R11.

Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи антитела 313R12. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит вариабельные области антитела 313R12, при этом указанные вариабельная область тяжелой цепи и/или вариабельная область легкой цепи из антитела 313R12 прошли аффинное созревание. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент содержит тяжелую цепь и легкую цепь антитела 313R12 (с лидерной последовательностью или без лидерной последовательности). Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент представляет собой антитело 313R12. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи и/или вариабельную область легкой цепи антитела 313R12, при этом указанные вариабельная область тяжелой цепи и/или вариабельная область легкой цепи были гуманизированы. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи и/или вариабельную область легкой цепи антитела 313R12 в гуманизированной форме. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи антитела 313R12 в виде части тяжелой цепи IgG1, IgG2 или IgG4.

Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент содержит, состоит по существу или состоит из антитела 313R12. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент содержит, состоит по существу или состоит из варианта антитела 313R12.

Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи антитела 313R14. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит вариабельные области антитела 313R14, при этом указанные вариабельная область тяжелой цепи и/или вариабельная область легкой цепи из антитела 313R14 прошли аффинное созревание. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент содержит тяжелую цепь и легкую цепь антитела 313R14 (с лидерной последовательностью или без лидерной последовательности). Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент представляет собой антитело 313R14. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи и/или вариабельную область легкой цепи антитела 313R14, при этом указанные вариабельная область тяжелой цепи и/или вариабельная область легкой цепи были гуманизированы. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи и/или вариабельную область легкой цепи антитела 313R14 в гуманизированной форме. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи антитела 313R14 в виде части тяжелой цепи IgG1, IgG2 или IgG4.

Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент содержит, состоит по существу или состоит из антитела 313R14. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент содержит, состоит по существу или состоит из варианта антитела 313R14.

Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи антитела 313R19. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит вариабельные области антитела 313R19, при этом указанные вариабельная область тяжелой цепи и/или вариабельная область легкой цепи из антитела 313R19 прошли аффинное созревание. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент содержит тяжелую цепь и легкую цепь антитела 313R19 (с лидерной последовательностью или без лидерной последовательности). Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент представляет собой антитело 313R19. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи и/или вариабельную область легкой цепи антитела 313R19, при этом указанные вариабельная область тяжелой цепи и/или вариабельная область легкой цепи были гуманизированы. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи и/или вариабельную область легкой цепи антитела 313R19 в гуманизированной форме. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи антитела 313R19 в виде части тяжелой цепи IgG1, IgG2 или IgG4.

Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент содержит, состоит по суще-

ству или состоит из антитела 313R19. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент содержит, состоит по существу или состоит из варианта антитела 313R19.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи, кодируемую плазмидой, депонированной в Американской коллекции типовых культур (ATCC), 10801 University Boulevard, Манассас, Виргиния, США, согласно условиям Будапештского договора от 27 мая 2015 г., и обозначаемой PTA-122180. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область легкой цепи, кодируемую плазмидой, депонированной в ATCC, 10801 University Boulevard, Манассас, Виргиния, США, согласно условиям Будапештского договора от 27 мая 2015 г., и обозначаемой PTA-122181. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи, кодируемую плазмидой, депонированной в ATCC и обозначаемой PTA-122180, и вариабельную область легкой цепи, кодируемую плазмидой, депонированной в ATCC и обозначаемой PTA-122181. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит тяжелую цепь, содержащую вариабельную область тяжелой цепи, кодируемую плазмидой, депонированной в ATCC и обозначаемой PTA-122180. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит легкую цепь, содержащую вариабельную область легкой цепи, кодируемую плазмидой, депонированной в ATCC и обозначаемой PTA-122181. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит тяжелую цепь, содержащую вариабельную область тяжелой цепи, кодируемую плазмидой, депонированной в ATCC и обозначаемой PTA-122180, и легкую цепь, содержащую вариабельную область легкой цепи, кодируемую плазмидой, депонированной в ATCC и обозначаемой PTA-122181.

Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложен связывающий TIGIT агент (например, антитело), который специфически связывает TIGIT, характеризующийся тем, что указанный связывающий TIGIT агент содержит одну, две, три, четыре, пять и/или шесть участков CDR антитела 313M26 или 313M32 (см. табл. 2). Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит один или более из участков CDR 313M26 или 313M32; два или более из участков CDR 313M26 или 313M32; три или более из участков CDR 313M26 или 313M32; четыре или более из участков CDR 313M26 или 313M32; пять или более из участков CDR 313M26 или 313M32; или все шесть участков CDR 313M26 или 313M32.

Таблица 2

	313M26 и 313M32
CDR1 тяжелой цепи (HC CDR1)	TSDYAWN (SEQ ID NO:57)
HC CDR2	YISYSGSTSYNPSLRS (SEQ ID NO:58)
HC CDR3	ARRQVGLGFAY (SEQ ID NO:59)
CDR1 легкой цепи (LC)	KASQDVSTAVA (SEQ ID NO:60)
LC CDR2	SASYRYT (SEQ ID NO:61)
LC CDR3	QQHYSTP (SEQ ID NO:62)

Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложен связывающий TIGIT агент (например, антитело), который специфически связывает TIGIT, характеризующийся тем, что указанный связывающий TIGIT агент содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащий TSDYAWN (SEQ ID NO: 57), CDR2 тяжелой цепи, содержащий YISYSGSTSYNPSLRS (SEQ ID NO: 58), и CDR3 тяжелой цепи, содержащий ARRQVGLGFAY (SEQ ID NO: 59). Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент дополнительно содержит CDR1 легкой цепи, содержащий KASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 60), CDR2 легкой цепи, содержащий SASYRYT (SEQ ID NO: 61), и CDR3 легкой цепи, содержащий QQHYSTP (SEQ ID NO: 62). Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит CDR1 легкой цепи, содержащий KASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 60), CDR2 легкой цепи, содержащий SASYRYT (SEQ ID NO: 61), и CDR3 легкой цепи, содержащий QQHYSTP (SEQ ID NO: 62). Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит: (a) CDR1 тяжелой цепи, содержащий TSDYAWN (SEQ ID NO: 57), CDR2 тяжелой цепи, содержащий YISYSGSTSYNPSLRS (SEQ ID NO: 58), и CDR3 тяжелой цепи, содержащий ARRQVGLGFAY (SEQ ID NO: 59); и (b) CDR1 легкой цепи, содержащий KASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 60), CDR2 легкой цепи,

содержащий SASYRYT (SEQ ID NO: 61), и CDR3 легкой цепи, содержащий QQHYSTP (SEQ ID NO: 62).

Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложен связывающий TIGIT агент (например, антитело), который специфически связывает TIGIT человека, характеризующийся тем, что указанный связывающий TIGIT агент содержит: (a) CDR1 тяжелой цепи, содержащий TSDYAWN (SEQ ID NO: 57), или ее вариант, содержащий 1, 2, 3 или 4 замены аминокислот; (b) CDR2 тяжелой цепи, содержащий YISYSGSTSYNPSLRS (SEQ ID NO: 58), или ее вариант, содержащий 1, 2, 3 или 4 замены аминокислот; (c) CDR3 тяжелой цепи, содержащий ARRQVGLGFAY (SEQ ID NO: 59), или ее вариант, содержащий 1, 2, 3 или 4 замены аминокислот; (d) CDR1 легкой цепи, содержащий KASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 60), или ее вариант, содержащий 1, 2, 3 или 4 замены аминокислот; (e) CDR2 легкой цепи, содержащий SASYRYT (SEQ ID NO: 61), или ее вариант, содержащий 1, 2, 3 или 4 замены аминокислот; и (f) CDR3 легкой цепи, содержащий QQHYSTP (SEQ ID NO: 62), или ее вариант, содержащий 1, 2, 3 или 4 замены аминокислот. Согласно некоторым вариантам реализации указанные замены аминокислот представляют собой консервативные замены. Согласно некоторым вариантам реализации указанные замены вносят в рамках процесса гуманизации. Согласно некоторым вариантам реализации указанные замены вносят в рамках процесса гуманизации зародышевой линии. Согласно некоторым вариантам реализации указанные замены вносят в рамках процесса оптимизации связывания.

Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложен связывающий TIGIT агент (например, антитело), который специфически связывает TIGIT, характеризующийся тем, что указанный связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи, отличающуюся по меньшей мере приблизительно 80% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 63 или SEQ ID NO: 67, и/или вариабельную область легкой цепи, отличающуюся по меньшей мере 80% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 64 или SEQ ID NO: 68. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи, отличающуюся по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 97% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 63. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи, отличающуюся по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 97% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 67. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область легкой цепи, отличающуюся по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 97% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 64. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область легкой цепи, отличающуюся по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 97% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 68. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи, отличающуюся по меньшей мере приблизительно 95% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 63 или SEQ ID NO: 67, и/или вариабельную область легкой цепи, отличающуюся по меньшей мере приблизительно 95% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 64 или SEQ ID NO: 68. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 63 или SEQ ID NO: 67, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 64 или SEQ ID NO: 68. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 63 или SEQ ID NO: 67, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 64 или SEQ ID NO: 68. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи, по существу состоящую из последовательности SEQ ID NO: 63 или SEQ ID NO: 67, и вариабельную область легкой цепи, по существу состоящую из последовательности SEQ ID NO: 64 или SEQ ID NO: 68. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 63 или SEQ ID NO: 67, и вариабельную область легкой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 64 или SEQ ID NO: 68.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 63, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 64. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент состоит из вариабельной области тяжелой цепи, по существу состоящей из последовательности SEQ ID NO: 63, и вариабельной области легкой цепи, по существу состоящей из последовательности SEQ ID NO: 64. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 63, и вариабельную область легкой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 64.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит вариа-

бельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 67, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 68. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи, по существу состоящую из последовательности SEQ ID NO: 67, и вариабельную область легкой цепи, по существу состоящую из последовательности SEQ ID NO: 68. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 67, и вариабельную область легкой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 68.

Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложен связывающий TIGIT агент (например, антитело), который специфически связывает TIGIT, характеризующийся тем, что указанный связывающий TIGIT агент содержит: тяжелую цепь, отличающуюся по меньшей мере 90% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 70, и/или легкую цепь, отличающуюся по меньшей мере 90% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 72. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит: тяжелую цепь, отличающуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 70, и/или легкую цепь, отличающуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 72. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 70, и/или легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 72. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит тяжелую цепь, состоящую по существу из последовательности SEQ ID NO: 70, и легкую цепь, состоящую по существу из последовательности SEQ ID NO: 72. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит тяжелую цепь, состоящую из SEQ ID NO: 70, и легкую цепь, состоящую из SEQ ID NO: 72.

Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложен связывающий TIGIT агент (например, антитело), который специфически связывает TIGIT, характеризующийся тем, что указанный связывающий TIGIT агент содержит: тяжелую цепь, отличающуюся по меньшей мере 90% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 82, и/или легкую цепь, отличающуюся по меньшей мере 90% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 72. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит: тяжелую цепь, отличающуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 82, и/или легкую цепь, отличающуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 72. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 82, и/или легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 72. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит тяжелую цепь, состоящую по существу из последовательности SEQ ID NO: 82, и легкую цепь, состоящую по существу из последовательности SEQ ID NO: 72. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит тяжелую цепь, состоящую из SEQ ID NO: 82, и легкую цепь, состоящую из SEQ ID NO: 72.

Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи антитела 313M26. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит вариабельные области антитела 313M26, при этом указанные вариабельная область тяжелой цепи и/или вариабельная область легкой цепи из антитела 313M26 прошли аффинное созревание. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент содержит тяжелую цепь и легкую цепь антитела 313M26 (с лидерной последовательностью или без лидерной последовательности). Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент представляет собой антитело 313M26. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи и/или вариабельную область легкой цепи антитела 313M26, при этом указанные вариабельная область тяжелой цепи и/или вариабельная область легкой цепи были гуманизированы. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи и/или вариабельную область легкой цепи антитела 313M26 в гуманизированной форме. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи антитела 313M26 в виде части тяжелой цепи IgG1, IgG2 или IgG4.

Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент содержит, состоит по существу или состоит из антитела 313M26. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент содержит, состоит по существу или состоит из варианта антитела 313M26.

Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи антитела 313M32. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит вариабельные области антитела 313M32, при этом указанные вариабельная область тяжелой цепи и/или вариабельная область легкой цепи из антитела 313M32 прошли аффинное созревание. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент содержит тяжелую цепь и легкую цепь антитела 313M32 (с лидерной последовательностью или без лидерной последовательности). Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент представляет собой антитело 313M32. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи антитела 313M32 в виде части тяжелой цепи

IgG1, IgG2 или IgG4. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи антитела 313M32 в виде части тяжелой цепи IgG1 человека. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи антитела 313M32 в виде части тяжелой цепи IgG2 человека. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи антитела 313M32 в виде части тяжелой цепи IgG4 человека. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент, который содержит вариабельную область тяжелой цепи антитела 313M32 в виде части тяжелой цепи IgG4 человека называется антителом 313M33.

Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент содержит, состоит по существу или состоит из антитела 313M32. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент содержит, состоит по существу или состоит из варианта антитела 313M32.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи, кодируемую плазмидой, депонированной в Американской коллекции типовых культур (ATCC), 10801 University Boulevard, Манассас, Виргиния, США, согласно условиям Будапештского договора от 11 августа 2015 г., и обозначаемой PTA-122346. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область легкой цепи, кодируемую плазмидой, депонированной в ATCC, 10801 University Boulevard, Манассас, Виргиния, США, согласно условиям Будапештского договора от 11 августа 2015 г., и обозначаемой PTA-122347. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит вариабельную область тяжелой цепи, кодируемую плазмидой, депонированной в ATCC и обозначаемой PTA-122346, и вариабельную область легкой цепи, кодируемую плазмидой, депонированной в ATCC и обозначаемой PTA-122347. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит тяжелую цепь, содержащую вариабельную область, кодируемую плазмидой, депонированной в ATCC и обозначаемой PTA-122346. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит легкую цепь, кодируемую плазмидой, депонированной в ATCC и обозначаемой PTA-122347. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент содержит тяжелую цепь, содержащую вариабельную область, кодируемую плазмидой, депонированной в ATCC и обозначаемой PTA-122346, и легкую цепь, кодируемую плазмидой, депонированной в ATCC и обозначаемой PTA-122347.

Настоящее изобретение также охватывает гомодимерные агенты/молекулы и гетеродимерные агенты/молекулы. Согласно некоторым вариантам реализации указанные гомодимерные агенты представляют собой полипептиды. Согласно некоторым вариантам реализации указанный гетеродимерные молекулы представляют собой полипептиды. Обычно гомодимерная молекула содержит два идентичных полипептида. Обычно гетеродимерная молекула содержит по меньшей мере два разных полипептида. Согласно некоторым вариантам реализации указанная гетеродимерная молекула способна к связыванию по меньшей мере двух мишеней, например представляет собой биспецифический агент. Указанные мишени представляют собой, например, два разных белка на одной клетке или два разных белка на двух отдельных клетках. Термин "плечо" может применяться в настоящем документе для описания структуры гомодимерного агента, гетеродимерного агента и/или биспецифического агента. Согласно некоторым вариантам реализации каждое плечо содержит по меньшей мере один полипептид. Обычно каждое плечо гетеродимерной молекулы обладает отличной функцией, например связывает две разных мишени. Согласно некоторым вариантам реализации одно плечо может содержать антигенсвязывающий сайт из антитела. Согласно некоторым вариантам реализации одно плечо может содержать связывающую часть рецептора. Согласно некоторым вариантам реализации одно плечо может содержать лиганд. Согласно некоторым вариантам реализации одно плечо может содержать связывающую область лиганда. Согласно некоторым вариантам реализации гомодимерный агент содержит два идентичных плеча. Согласно некоторым вариантам реализации гетеродимерный агент содержит два разных плеча. Согласно некоторым вариантам реализации биспецифический агент содержит два разных плеча.

Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложен связывающий TIGIT агент, который представляет собой гомодимерную молекулу. Согласно некоторым вариантам реализации указанная гомодимерная молекула содержит два идентичных полипептида. Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложен связывающий TIGIT агент, который представляет собой гетеродимерную молекулу. Согласно некоторым вариантам реализации указанная гетеродимерная молекула содержит по меньшей мере два разных полипептида. Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложен связывающий TIGIT агент, который представляет собой гетеродимерный агент. Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложен связывающий TIGIT агент, который представляет собой биспецифический агент. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело.

Согласно некоторым вариантам реализации гетеродимерный агент (например, биспецифический агент) содержит связывающий TIGIT агент, описанный в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации гетеродимерный агент содержит агент, стимулирующий иммунный ответ, или его функциональный фрагмент. Согласно некоторым вариантам реализации гетеродимерная молекула имеет

по меньшей мере две функции (i) связывание с TIGIT и (ii) связывание с второй мишенью. Согласно некоторым вариантам реализации гетеродимерный агент имеет по меньшей мере две функции, (i) связывание с TIGIT и (ii) "несвязывающую" функцию. Согласно некоторым вариантам реализации гетеродимерная молекула содержит второй иммунотерапевтический агент или его функциональный фрагмент. Согласно некоторым вариантам реализации одно плечо гетеродимерной молекулы содержит связывающий TIGIT агент, описанный в настоящем документе; и одно плечо гетеродимерной молекулы содержит второй иммунотерапевтический агент. Согласно некоторым вариантам реализации одно плечо гетеродимерного агента содержит связывающий TIGIT агент, описанный в настоящем документе, и одно плечо гетеродимерного агента содержит агент, стимулирующий иммунный ответ. В настоящем документе выражение "агент, стимулирующий иммунный ответ" применяют в максимально широком смысле и относится к веществу, которое прямо или непрямо стимулирует иммунную систему путем индукции активации или повышения активности любых компонентов иммунной системы. Например, стимулирующие иммунный ответ агенты могут включать цитокины, а также различные антигены, в том числе опухолевые антигены и антигены, происходящие из патогенов. Согласно некоторым вариантам реализации указанный второй иммунотерапевтический агент (например, агент, стимулирующий иммунный ответ) включает, однако не ограничиваясь перечисленным, колониестимулирующий фактор (например, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМКСФ), макрофагальный колониестимулирующий фактор (МКСФ), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (ГКСФ), фактор стволовых клеток (ФСК)), интерлейкин (например, ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-7, ИЛ-12, ИЛ-15, ИЛ-18), цитокин (например, γ-интерферон), антитело, которое блокирует иммуносупрессивные функции (например, антитело против CTLA4, антитело против CD28, антитело против PD-1, антитело против PD-L1), Toll-подобный рецептор (например, TLR4, TLR7, TLR9) или представитель семейства B7 (например, CD80, CD86). Согласно некоторым вариантам реализации указанный иммунотерапевтический агент включает, однако не ограничиваясь перечисленным, агонистическое антитело (например, антитело против GITR, антитело против OX40) или агонистический лиганд (например, GITRL или OX40L).

Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой гетеродимерную молекулу (например, биспецифический агент), который содержит первый CH3-домен и второй CH3-домен, каждый из которых модифицирован таким образом, чтобы стимулировать образование гетеромультимеров. Согласно некоторым вариантам реализации указанные первый и второй CH3-домены модифицированы с применением принципа "выступы-во-впадины". Согласно некоторым вариантам реализации указанные первый и второй CH3-домены содержат изменения аминокислот, которые приводят к измененным электростатическим взаимодействиям. Согласно некоторым вариантам реализации указанные первый и второй CH3-домены содержат изменения аминокислот, которые приводят к изменению гидрофобных/гидрофильных взаимодействий.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифический агент, который содержит константные области тяжелых цепей, выбранные из группы, состоящей из: (a) первой константной области IgG1 человека, при этом аминокислоты, соответствующие положениям 253 и 292 IgG1 (SEQ ID NO: 41), заменены на глутамат или аспартат, и второй константной области IgG1 человека, при этом аминокислоты, соответствующие положениям 240 и 282 IgG1 (SEQ ID NO: 41), заменены на лизин; (b) первой константной области IgG2 человека, при этом аминокислоты, соответствующие положениям 249 и 288 IgG2 (SEQ ID NO: 42), заменены на глутамат или аспартат, и второй константной области IgG2 человека, при этом аминокислоты, соответствующие положениям 236 и 278 IgG2 (SEQ ID NO: 42), заменены на лизин; (c) первой константной области IgG3 человека, при этом аминокислоты, соответствующие положениям 300 и 339 IgG3 (SEQ ID NO: 43), заменены на глутамат или аспартат, и второй константной области IgG3 человека, при этом аминокислоты, соответствующие положениям 287 и 329 IgG3 (SEQ ID NO: 43), заменены на лизин; и (d) первой константной области IgG4 человека, при этом аминокислоты, соответствующие положениям 250 и 289 IgG4 (SEQ ID NO: 44), заменены на глутамат или аспартат, и второй константной области IgG4, при этом аминокислоты, соответствующие положениям 237 и 279 IgG4 (SEQ ID NO: 44), заменены на лизин.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифический агент, который содержит первую константную область IgG1 человека с заменами аминокислот в положениях, соответствующих положениям 253 и 292 IgG1 (SEQ ID NO: 41), при этом указанные аминокислоты в положениях, соответствующих положениям 253 и 292 IgG1 (SEQ ID NO: 41), заменены на глутамат или аспартат, и вторую константную область IgG1 человека с заменами аминокислот в положениях, соответствующих положениям 240 и 282 IgG1 (SEQ ID NO: 41), при этом указанные аминокислоты в положениях, соответствующих положениям 240 и 282 IgG1 (SEQ ID NO: 41), заменены на лизин. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, которое содержит первую константную область IgG2 человека с заменами аминокислот в положениях, соответствующих положениям 249 и 288 IgG2 (SEQ ID NO: 42), при этом указанные аминокислоты в положениях, соответствующих положениям 249 и 288 IgG2 (SEQ ID NO: 42), заменены на глутамат или аспартат, и вторую константную область IgG2 человека с заменами аминокислот в положениях, соответствующих положениям 236 и 278 IgG2 (SEQ ID NO: 42), при этом

указанные аминокислоты в положениях, соответствующих положениям 236 и 278 IgG2 (SEQ ID NO: 42), заменены на лизин. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, которое содержит первую константную область IgG3 человека с заменами аминокислот в положениях, соответствующих положениям 300 и 339 IgG3 (SEQ ID NO: 43), при этом указанные аминокислоты в положениях, соответствующих положениям 300 и 339 IgG3 (SEQ ID NO: 43), заменены на глутамат или аспартат, и вторую константную область IgG3 человека с заменами аминокислот в положениях, соответствующих положениям 287 и 329 IgG3 (SEQ ID NO: 43), при этом указанные аминокислоты в положениях, соответствующих положениям 287 и 329 IgG3 (SEQ ID NO: 43), заменены на лизин. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, которое содержит первую константную область IgG4 человека с заменами аминокислот в положениях, соответствующих положениям 250 и 289 IgG4 (SEQ ID NO: 44), при этом указанные аминокислоты в положениях, соответствующих положениям 250 и 289 IgG4 (SEQ ID NO: 44), заменены на глутамат или аспартат, и вторую константную область IgG4 человека с заменами аминокислот в положениях, соответствующих положениям 237 и 279 IgG4 (SEQ ID NO: 44), при этом указанные аминокислоты в положениях, соответствующих положениям 237 и 279 IgG4 (SEQ ID NO: 44), заменены на лизин.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифический агент, который содержит первую константную область IgG1 человека с заменами аминокислот в положениях, соответствующих положениям 253 и 292 IgG1 (SEQ ID NO: 41), при этом указанные аминокислоты заменены на глутамат, и вторую константную область IgG1 человека с заменами аминокислот в положениях, соответствующих положениям 240 и 282 IgG1 (SEQ ID NO: 41), при этом указанные аминокислоты заменены на лизин. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, которое содержит первую константную область IgG1 человека с заменами аминокислот в положениях, соответствующих положениям 253 и 292 IgG1 (SEQ ID NO: 41), при этом указанные аминокислоты заменены на аспартат, и вторую константную область IgG1 человека с заменами аминокислот в положениях, соответствующих положениям 240 и 282 IgG1 (SEQ ID NO: 41), при этом указанные аминокислоты заменены на лизин.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифический агент, который содержит первую константную область IgG2 человека с заменами аминокислот в положениях, соответствующих положениям 249 и 288 IgG2 (SEQ ID NO: 42), при этом указанные аминокислоты заменены на глутамат, и вторую константную область IgG2 человека с заменами аминокислот в положениях, соответствующих положениям 236 и 278 IgG2 (SEQ ID NO: 42), при этом указанные аминокислоты заменены на лизин. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, которое содержит первую константную область IgG2 человека с заменами аминокислот в положениях, соответствующих положениям 249 и 288 IgG2 (SEQ ID NO: 42), при этом указанные аминокислоты заменены на аспартат, и вторую константную область IgG2 человека с заменами аминокислот в положениях, соответствующих положениям 236 и 278 IgG2 (SEQ ID NO: 42), при этом указанные аминокислоты заменены на лизин.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифический агент, который содержит константную область тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 45. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, которое содержит константную область тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 46. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, которое содержит константную область тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 47. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, которое содержит константную область тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 48. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, которое содержит первую константную область тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 45 и вторую константную область тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 46. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, которое содержит первую константную область тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 47 и вторую константную область тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 48.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифический агент, который содержит константную область тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 49. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, которое содержит константную область тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 50. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, которое содержит константную область тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 51. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, которое содержит константную область тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 52. Согласно некоторым вариантам реализа-

ции указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, которое содержит первую константную область тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 49 и вторую константную область тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 50. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, которое содержит первую константную область тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 51 и вторую константную область тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 52.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, содержащее первый антигенсвязывающий сайт, который специфически связывает TIGIT человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, содержащее первый антигенсвязывающий сайт, который специфически связывает TIGIT человека, и второй антигенсвязывающий сайт, который связывает вторую мишень. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, содержащее: первый антигенсвязывающий сайт, который специфически связывает TIGIT человека, при этом указанный первый антигенсвязывающий сайт содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащий GSSLSSSYMS (SEQ ID NO: 7) или GFSLSSSYMS (SEQ ID NO: 13), CDR2 тяжелой цепи, содержащий IIGSNGNTYYANWAKG (SEQ ID NO: 8), и CDR3 тяжелой цепи, содержащий GGYRTSGMDP (SEQ ID NO: 9). Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, содержащее: первый антигенсвязывающий сайт, который специфически связывает TIGIT человека, при этом указанный первый антигенсвязывающий сайт содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащий GSSLSSSYMS (SEQ ID NO: 7), CDR2 тяжелой цепи, содержащий IIGSNGNTYYANWAKG (SEQ ID NO: 8), и CDR3 тяжелой цепи, содержащий GGYRTSGMDP (SEQ ID NO: 9). Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, содержащее: первый антигенсвязывающий сайт, который специфически связывает TIGIT человека, при этом указанный первый антигенсвязывающий сайт содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащий GFSLSSSYMS (SEQ ID NO: 13), CDR2 тяжелой цепи, содержащий IIGSNGNTYYANWAKG (SEQ ID NO: 8), и CDR3 тяжелой цепи, содержащий GGYRTSGMDP (SEQ ID NO: 9). Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, содержащее: первый антигенсвязывающий сайт, который специфически связывает TIGIT человека, при этом указанный первый антигенсвязывающий сайт содержит: (a) CDR1 тяжелой цепи, содержащий GSSLSSSYMS (SEQ ID NO: 7) или GFSLSSSYMS (SEQ ID NO: 13), CDR2 тяжелой цепи, содержащий IIGSNGNTYYANWAKG (SEQ ID NO: 8), и CDR3 тяжелой цепи, содержащий GGYRTSGMDP (SEQ ID NO: 9), и (b) второй антигенсвязывающий сайт, при этом указанный первый антигенсвязывающий сайт и указанный второй антигенсвязывающий сайт содержат одинаковую (т.е. идентичную) легкую цепь. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, содержащее: первый антигенсвязывающий сайт, который специфически связывает TIGIT человека, при этом указанный первый антигенсвязывающий сайт содержит (a) CDR1 тяжелой цепи, содержащий GSSLSSSYMS (SEQ ID NO: 7) или GFSLSSSYMS (SEQ ID NO: 13), CDR2 тяжелой цепи, содержащий IIGSNGNTYYANWAKG (SEQ ID NO: 8), и CDR3 тяжелой цепи, содержащий GGYRTSGMDP (SEQ ID N0:9), CDR1 легкой цепи, содержащий QASQSISSYLNW (SEQ ID NO: 10), QASQSNIYSDLAW (SEQ ID NO: 14) или QASQNIYSDLAW (SEQ ID NO: 81), CDR2 легкой цепи, содержащий DALKLAS (SEQ ID NO: 11) или RASTLAS (SEQ ID NO: 15), и CDR3 легкой цепи, содержащий QQEHSVGNVDN (SEQ ID NO: 12) или QQEHLVAWIYN (SEQ ID NO: 16) и (b) второй антигенсвязывающий сайт. Согласно некоторым вариантам реализации указанное биспецифическое антитело содержит первый антигенсвязывающий сайт, содержащий CDR1 легкой цепи, содержащий QASQSISSYLNW (SEQ ID NO: 10), QASQSNIYSDLAW (SEQ ID NO: 14) или QASQNIYSDLAW (SEQ ID NO: 81), CDR2 легкой цепи, содержащий DALKLAS (SEQ ID NO: 11) или RASTLAS (SEQ ID NO: 15), и CDR3 легкой цепи, содержащий QQEHSVGNVDN (SEQ ID NO: 12) или QQEHLVAWIYN (SEQ ID NO: 16).

Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, содержащее первую вариабельную область тяжелой цепи, отличающуюся по меньшей мере приблизительно 80% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO: 32. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, содержащее первую вариабельную область тяжелой цепи, отличающуюся по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 97% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO: 32. Согласно некоторым вариантам реализации указанное биспецифическое антитело содержит вариабельную область легкой цепи, отличающуюся по меньшей мере приблизительно 80% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 20. Согласно некоторым вариантам реализации указанное биспецифическое антитело содержит вариабельную область легкой цепи, отличающуюся по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 97% или по меньшей мере приблизительно 99% идентич-

ностью последовательности SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 20. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, содержащее первую вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 17. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, содержащее первую вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 19. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, содержащее первую вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 32. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, содержащее первую вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 18. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, содержащее первую вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 20.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, содержащее первую вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 17, и первую константную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51 или SEQ ID NO: 52. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, содержащее первую вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 19, и первую константную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51 или SEQ ID NO: 52. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, содержащее первую вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 32, и первую константную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51 или SEQ ID NO: 52.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, содержащее первый антигенсвязывающий сайт, который специфически связывает TIGIT человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, содержащее первый антигенсвязывающий сайт, который специфически связывает TIGIT человека, и второй антиген связывающий сайт, который связывает вторую мишень. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, содержащее: первый антигенсвязывающий сайт, который специфически связывает TIGIT человека, при этом указанный первый антигенсвязывающий сайт содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащий TSDYAWN (SEQ ID NO: 57), CDR2 тяжелой цепи, содержащий YISYSGSTSYNPSLRS (SEQ ID NO: 58), и CDR3 тяжелой цепи, содержащий ARRQVGLGFAY (SEQ ID NO: 59). Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, содержащее: первый антигенсвязывающий сайт, который специфически связывает TIGIT человека, при этом указанный первый антигенсвязывающий сайт содержит (a) CDR1 тяжелой цепи, содержащий TSDYAWN (SEQ ID NO: 57), CDR2 тяжелой цепи, содержащий YISYSGSTSYNPSLRS (SEQ ID NO: 58), и CDR3 тяжелой цепи, содержащий ARRQVGLGFAY (SEQ ID NO: 59); и (b) второй антигенсвязывающий сайт, при этом указанный первый антигенсвязывающий сайт и указанный второй антигенсвязывающий сайт содержат одинаковую (т.е. идентичную) легкую цепь. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, содержащее: первый антигенсвязывающий сайт, который специфически связывает TIGIT человека, при этом указанный первый антигенсвязывающий сайт содержит: (a) CDR1 тяжелой цепи, содержащий TSDYAWN (SEQ ID NO: 57), CDR2 тяжелой цепи, содержащий YISYSGSTSYNPSLRS (SEQ ID NO: 58), и CDR3 тяжелой цепи, содержащий ARRQVGLGFAY (SEQ ID NO: 59), CDR1 легкой цепи, содержащий KASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 60), CDR2 легкой цепи, содержащий SASYRYT (SEQ ID NO: 61), и CDR3 легкой цепи, содержащий QQHYSTP (SEQ ID NO: 62); и (b) второй антигенсвязывающий сайт. Согласно некоторым вариантам реализации указанное биспецифическое антитело содержит первый антигенсвязывающий сайт, содержащий CDR1 легкой цепи, содержащий KASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 60), CDR2 легкой цепи, содержащий SASYRYT (SEQ ID NO: 61), и CDR3 легкой цепи, содержащий QQHYSTP (SEQ ID NO: 62).

Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, содержащее первую вариабельную область тяжелой цепи, отличающуюся по меньшей мере приблизительно 80% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 63 или SEQ ID NO: 67. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, содержащее первую вариабельную область тяжелой цепи, отличающуюся по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 97% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 63 или SEQ ID NO: 67. Согласно некоторым вариантам реализации указанное биспецифическое антитело содержит вариабельную область легкой цепи, отличающуюся по меньшей мере приблизительно 80% идентичностью последовательности SEQ ID NO:

64 или SEQ ID NO: 68. Согласно некоторым вариантам реализации указанное биспецифическое антитело содержит вариабельную область легкой цепи, отличающуюся по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 97% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 64 или SEQ ID NO: 68. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, содержащее первую вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 63. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, содержащее первую вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 67. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, содержащее первую вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 64. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, содержащее первую вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 68.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, содержащее первую вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 63, и первую константную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51 или SEQ ID NO: 52. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, содержащее первую вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 67, и первую константную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51 или SEQ ID NO: 52.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, специфически связывающее TIGIT человека и вторую мишень. Согласно некоторым вариантам реализации указанная вторая мишень представляет собой опухолевый антиген. Согласно некоторым вариантам реализации указанное биспецифическое антитело содержит связывающий TIGIT агент, описанный в настоящем документе, и второй полипептид, содержащий антитело, специфически связывающее опухолевый антиген. Биспецифическое антитело, обладающее специфичностью связывания в отношении опухолевого антигена, может применяться для направления связывающего TIGIT агента к опухоли. Это может быть полезно для индукции и/или усиления иммунного ответа рядом с опухолью или в пределах микроокружения опухоли. Согласно некоторым вариантам реализации биспецифическое антитело может применяться для индукции или усиления активности инфильтрирующих опухоль иммунных клеток. Согласно некоторым вариантам реализации биспецифическое антитело может применяться для индукции или усиления активности инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL). Согласно некоторым вариантам реализации биспецифическое антитело может применяться для ингибирования или снижения активности клеток Treg. Согласно некоторым вариантам реализации биспецифическое антитело может применяться для ингибирования или снижения активности СКМП.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, характеризующееся тем, что первая мишень представляет собой TIGIT, а вторая мишень расположена на клетке иммунного ответа. Согласно некоторым вариантам реализации указанная вторая мишень расположена на Т-клетке, NK-клетке, В-клетке, макрофаге, дендритной клетке или миелоидной клетке. Согласно некоторым вариантам реализации указанная вторая мишень представляет собой PD-1, PD-L1, CTLA4, TIM-3, LAG-3, GITR, OX-40, GITRL или OX-40L. Согласно некоторым вариантам реализации указанная вторая мишень представляет собой CD28 или 4-1BB.

Согласно некоторым вариантам реализации биспецифическое антитело содержит первое плечо, содержащее связывающий TIGIT агент, описанный в настоящем документе, и второе плечо содержащее антитело, специфически связывающее PD-1. Согласно некоторым вариантам реализации биспецифическое антитело содержит первое плечо, содержащее связывающий TIGIT агент, описанный в настоящем документе, и второе плечо, содержащее антитело, специфически связывающее PD-L1. Согласно некоторым вариантам реализации биспецифическое антитело содержит первое плечо, содержащее связывающий TIGIT агент, описанный в настоящем документе, и второе плечо, содержащее антитело, специфически связывающее GITR. Согласно некоторым вариантам реализации биспецифическое антитело содержит первое плечо, содержащее связывающий TIGIT агент, описанный в настоящем документе, и второе плечо, содержащее антитело, специфически связывающее OX-40. Согласно некоторым вариантам реализации биспецифическое антитело содержит первое плечо, содержащее связывающее TIGIT антитело, описанное в настоящем документе, и второе плечо, содержащее антитело, специфически связывающее CD40. Согласно некоторым вариантам реализации биспецифическое антитело содержит первое плечо, содержащее связывающий TIGIT агент, описанный в настоящем документе, и второе плечо, содержащее антитело, специфически связывающее CTLA4. Согласно некоторым вариантам реализации биспецифическое антитело содержит первое плечо, содержащее связывающее TIGIT антитело, описанное в настоящем документе, и второе плечо, содержащее антитело, специфически связывающее CD28. Согласно некоторым вариантам реализации биспецифическое антитело содержит первое плечо, содержащее связывающий TIGIT агент, описанный в настоящем документе, и второе плечо, содержащее антитело, специ-

фически связывающее GITRL. Согласно некоторым вариантам реализации биспецифическое антитело содержит первое плечо, содержащее связывающий TIGIT агент, описанный в настоящем документе, и второе плечо, содержащее антитело, специфически связывающее OX-40L.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, которое содержит вариабельную область тяжелой цепи из антитела против TIGIT 313R11. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, которое содержит вариабельную область тяжелой цепи из антитела против TIGIT 313R12. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, которое содержит вариабельную область тяжелой цепи из антитела против TIGIT 313R14. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, которое содержит вариабельную область тяжелой цепи из антитела против TIGIT 313R19 или 313R20. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, которое содержит вариабельную область легкой цепи из антитела против TIGIT 313R11 или 313R12. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, которое содержит вариабельную область легкой цепи из антитела против TIGIT 313R14, 313R19 или 313R20.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, которое содержит вариабельную область тяжелой цепи из антитела против TIGIT 313M26. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, которое содержит вариабельную область легкой цепи из антитела против TIGIT 313M26.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, которое содержит вариабельную область тяжелой цепи из антитела против TIGIT 313M32. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифическое антитело, которое содержит вариабельную область легкой цепи из антитела против TIGIT 313M32.

Согласно некоторым вариантам реализации биспецифический агент содержит первое плечо, содержащее связывающий TIGIT агент, описанный в настоящем документе, и второе плечо, содержащее полипептид, содержащий GITRL, который специфически связывает GITR Согласно некоторым вариантам реализации указанное второе плечо содержит полипептид, содержащий по меньшей мере одну копию внеклеточного домена GITRL. Согласно некоторым вариантам реализации биспецифический агент содержит первое плечо, содержащее связывающий TIGIT агент, описанный в настоящем документе, и второе плечо, содержащее полипептид, содержащий OX-40L, который специфически связывает OX-40. Согласно некоторым вариантам реализации указанное второе плечо содержит полипептид, содержащий по меньшей мере одну копию внеклеточного домена OX-40L. Согласно некоторым вариантам реализации биспецифический агент содержит первое плечо, содержащее связывающий TIGIT агент, описанный в настоящем документе, и второе плечо, содержащее полипептид, содержащий CD40L, который специфически связывает CD40. Согласно некоторым вариантам реализации указанное второе плечо содержит полипептид, содержащий по меньшей мере одну копию внеклеточного домена CD40L. Согласно некоторым вариантам реализации биспецифический агент содержит первое плечо, содержащее связывающий TIGIT агент, описанный в настоящем документе, и второе плечо, содержащее полипептид, содержащий лиганд 4-1BB, который специфически связывает 4-1BB. Согласно некоторым вариантам реализации указанное второе плечо содержит полипептид, содержащий по меньшей мере одну копию внеклеточного домена лиганда 4-1BB.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифический агент, который связывает TIGIT с K_D, составляющей приблизительно 50 нМ или менее, приблизительно 25 нМ или менее, приблизительно 10 нМ или менее, приблизительно 1 нМ или менее; или приблизительно 0,1 нМ или менее. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифический агент, который связывает вторую мишень с K_D, составляющей приблизительно 50 нМ или менее, приблизительно 25 нМ или менее, приблизительно 10 нМ или менее, приблизительно 1 нМ или менее; или приблизительно 0,1 нМ или менее. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифический агент, который связывает TIGIT с K_D, составляющей приблизительно 50 нМ или менее, и связывает вторую мишень с K_D, составляющей приблизительно 50 нМ или менее. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифический агент, который связывает TIGIT с K_D, составляющей приблизительно 25 нМ или менее, и связывает вторую мишень с K_D, составляющей приблизительно 25 нМ или менее. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифический агент, который связывает TIGIT с K_D, составляющей приблизительно 10 нМ или менее, и связывает вторую мишень с K_D, составляющей приблизительно 10 нМ или менее.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет со-

бой биспецифический агент, который связывает TIGIT с K_D, составляющей приблизительно 1 нМ или менее, и связывает вторую мишень с K_D, составляющей приблизительно 1 нМ или менее.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой биспецифический агент, который содержит один антигенсвязывающий сайт со сродством к связыванию, которое слабее сродства к связыванию второго антигенсвязывающего сайта. Например, согласно некоторым вариантам реализации указанный биспецифический агент может связывать TIGIT с K_D в диапазоне от приблизительно 0,1 до 1 нМ, и может связывать вторую мишень с K_D в диапазоне от приблизительно 1 до 10 нМ, или указанный биспецифический агент может связывать TIGIT с K_D в диапазоне от приблизительно 1 до 10 нМ, и может связывать вторую мишень с K_D в диапазоне от приблизительно 0,1 до 1 нМ. Согласно некоторым вариантам реализации указанный биспецифический агент может связывать TIGIT с K_D в диапазоне от приблизительно 0,1 до 1 нМ, и может связывать вторую мишень с K_D в диапазоне от приблизительно 1 до 10 нМ, или указанный биспецифический агент может связывать TIGIT с K_D в диапазоне от приблизительно 1 до 10 нМ, и может связывать вторую мишень с K_D в диапазоне от приблизительно 0,1 до 1 нМ. Согласно некоторым вариантам реализации указанная разница в аффинности между двумя антигенсвязывающими сайтами может быть приблизительно 2-кратной или более, приблизительно 3-кратной или более, приблизительно 5-кратной или более, приблизительно 8-кратной или более, приблизительно 10-кратной или более, приблизительно 15-кратной или более, приблизительно 30-кратной или более, приблизительно 50-кратной или более, или приблизительно 100-кратной или более. Согласно некоторым вариантам реализации по меньшей мере один остаток аминокислоты по меньшей мере в одном CDR антигенсвязывающего сайта TIGIT заменена другой аминокислотой таким образом, что аффинность сайта связывания TIGIT изменяется. Согласно некоторым вариантам реализации аффинность сайта связывания TIGIT увеличивается. Согласно некоторым вариантам реализации аффинность сайта связывания TIGIT уменьшается. Согласно некоторым вариантам реализации по меньшей мере один остаток аминокислоты по меньшей мере в одном CDR антигенсвязывающего сайта для второй мишени заменена другой аминокислотой таким образом, что аффинность второго антигенсвязывающего сайта изменяется. Согласно некоторым вариантам реализации аффинность второго антигенсвязывающего сайта увеличивается. Согласно некоторым вариантам реализации аффинность второго антигенсвязывающего сайта уменьшается. Согласно некоторым вариантам реализации изменяется аффинность как сайта связывания TIGIT, так и сайта связывания второго антигена.

В настоящем изобретении предложены полипептиды, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, антитела, которые специфически связывают TIGIT. Согласно некоторым вариантам реализации полипептид связывает TIGIT человека. Согласно некоторым вариантам реализации полипептид связывает TIGIT мыши. Согласно некоторым вариантам реализации полипептид связывает TIGIT мыши и TIGIT человека. Согласно некоторым вариантам реализации полипептид связывает TIGIT человека и не связывает TIGIT мыши. Согласно некоторым вариантам реализации полипептид связывает TIGIT человека и не связывает TIGIT крысы. Согласно некоторым вариантам реализации полипептид связывает TIGIT человека и не связывает TIGIT кролика. Согласно некоторым вариантам реализации полипептид связывает TIGIT человека и не связывает TIGIT игрунковых. Согласно некоторым вариантам реализации полипептид связывает TIGIT человека и не связывает TIGIT собаки. Согласно некоторым вариантам реализации полипептид связывает TIGIT человека и не связывает TIGIT свиней. Согласно некоторым вариантам реализации полипептид связывает TIGIT человека и не связывает TIGIT яванского макака. Согласно некоторым вариантам реализации полипептид связывает TIGIT человека и не связывает TIGIT макака-резуса.

Согласно некоторым вариантам реализации полипептид содержит одну, две, три, четыре, пять и/или шесть участков CDR антитела 313R11, 313R12, 313R14 или 313R19 (см. табл. 1 в настоящем документе). Антитело 313R20 содержит те же участки CDR, а также вариабельные домены тяжелых и легких цепей, что и антитело 313R19, однако 313R20 содержит указанные области и домены в формате IgG4. Согласно некоторым вариантам реализации полипептид содержит область(и) CDR, содержащую(ие) до четырех (т.е. 0, 1, 2, 3 или 4) замен аминокислот на каждую CDR. Согласно некоторым вариантам реализации указанная(ые) область(и) CDR тяжелых цепей входят в состав вариабельной области тяжелой цепи. Согласно некоторым вариантам реализации указанная(ые) область(и) CDR легких цепей входит(ят) в состав вариабельной области легкой цепи.

Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложен полипептид, который специфически связывает TIGIT, характеризующийся тем, что указанный полипептид содержит последовательность аминокислот, отличающуюся по меньшей мере приблизительно 80% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO: 32, и/или последовательность аминокислот, отличающуюся по меньшей мере приблизительно 80% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 20. Согласно некоторым вариантам реализации указанный полипептид содержит последовательность аминокислот, отличающуюся по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 97% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO: 32. Согласно некоторым вариантам реализации указанный полипеп-

тид содержит последовательность аминокислот, отличающуюся по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 97% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 20. Согласно некоторым вариантам реализации указанный полипептид содержит последовательность аминокислот, отличающуюся по меньшей мере приблизительно 95% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO: 32, и/или последовательность аминокислот, отличающуюся по меньшей мере приблизительно 95% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 20. Согласно некоторым вариантам реализации указанный полипептид содержит последовательность аминокислот, содержащую SEQ ID NO: 17, и/или последовательность аминокислот, содержащую SEQ ID NO: 18. Согласно некоторым вариантам реализации указанный полипептид содержит последовательность аминокислот, содержащую SEQ ID NO: 19, и/или последовательность аминокислот, содержащую SEQ ID NO: 20. Согласно некоторым вариантам реализации указанный полипептид содержит последовательность аминокислот, содержащую SEQ ID NO: 32, и/или последовательность аминокислот, содержащую SEQ ID NO: 20.

Согласно некоторым вариантам реализации полипептид содержит последовательность аминокислот, содержащую SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 и/или SEQ ID NO: 32. Согласно определению в настоящем документе полипептид может быть получен в одноцепочечном виде или в виде двух или более ассоциированных цепей. Согласно некоторым вариантам реализации полипептид содержит последовательность аминокислот, содержащую SEQ ID NO: 17, и последовательность аминокислот, содержащую SEQ ID NO: 18. Согласно некоторым вариантам реализации полипептид содержит последовательность аминокислот, содержащую SEQ ID NO: 19, и последовательность аминокислот, содержащую SEQ ID NO: 20. Согласно некоторым вариантам реализации полипептид содержит последовательность аминокислот, содержащую SEQ ID NO: 32, и последовательность аминокислот, содержащую SEQ ID NO: 20. Согласно некоторым вариантам реализации указанный полипептид содержит последовательность аминокислот, состоящую по существу из последовательности SEQ ID NO: 17, и последовательность аминокислот, состоящую по существу из последовательности SEQ ID NO: 18. Согласно некоторым вариантам реализации указанный полипептид содержит последовательность аминокислот, состоящую по существу из последовательности SEQ ID NO: 19, и последовательность аминокислот, состоящую по существу из последовательности SEQ ID NO: 20. Согласно некоторым вариантам реализации указанный полипептид содержит последовательность аминокислот, состоящую по существу из последовательности SEQ ID NO: 32, и последовательность аминокислот, состоящую по существу из последовательности SEQ ID NO: 20. Согласно некоторым вариантам реализации указанный полипептид содержит последовательность аминокислот, состоящую из SEQ ID NO: 17, и последовательность аминокислот, состоящую из SEQ ID NO: 18. Согласно некоторым вариантам реализации указанный полипептид содержит последовательность аминокислот, состоящую из SEQ ID NO: 19, и последовательность аминокислот, состоящую из SEQ ID NO: 20. Согласно некоторым вариантам реализации указанный полипептид содержит последовательность аминокислот, состоящую из SEQ ID NO: 32, и последовательность аминокислот, состоящую из SEQ ID NO: 20.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный полипептид содержит последовательность аминокислот, содержащую SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 55 и/или SEQ ID NO: 56. Согласно некоторым вариантам реализации указанный полипептид содержит последовательность аминокислот, содержащую SEQ ID NO: 21, и последовательность аминокислот, содержащую SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации указанный полипептид содержит последовательность аминокислот, содержащую SEQ ID NO: 22, и последовательность аминокислот, содержащую SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации указанный полипептид содержит последовательность аминокислот, содержащую SEQ ID NO: 24, и последовательность аминокислот, содержащую SEQ ID NO: 25. Согласно некоторым вариантам реализации указанный полипептид содержит последовательность аминокислот, содержащую SEQ ID NO: 33, и последовательность аминокислот, содержащую SEQ ID NO: 25. Согласно некоторым вариантам реализации указанный полипептид содержит последовательность аминокислот, содержащую SEQ ID NO: 55, и последовательность аминокислот, содержащую SEQ ID NO: 25. Согласно некоторым вариантам реализации указанный полипептид содержит последовательность аминокислот, содержащую SEQ ID NO: 26, и последовательность аминокислот, содержащую SEQ ID NO: 28. Согласно некоторым вариантам реализации указанный полипептид содержит последовательность аминокислот, содержащую SEQ ID NO: 27, и последовательность аминокислот, содержащую SEQ ID NO: 28. Согласно некоторым вариантам реализации указанный полипептид содержит последовательность аминокислот, содержащую SEQ ID NO: 29, и последовательность аминокислот, содержащую SEQ ID NO: 30. Согласно некоторым вариантам реализации указанный полипептид содержит последовательность аминокислот, содержащую SEQ ID NO: 34, и последовательность аминокислот, содержащую SEQ ID NO: 30. Согласно некоторым вариантам реализации указанный полипептид содержит последовательность аминокислот, содержащую SEQ ID NO: 56, и последовательность аминокислот, содержащую SEQ ID NO: 30.

Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент содержит полипептид, содержащий последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34 и SEQ ID NO: 56.

Согласно некоторым вариантам реализации полипептид содержит последовательность аминокислот, состоящую из SEQ ID NO: 21, и последовательность аминокислот, состоящую из SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации полипептид содержит последовательность аминокислот, состоящую из SEQ ID NO: 22, и последовательность аминокислот, состоящую из SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации полипептид содержит последовательность аминокислот, состоящую из SEQ ID NO: 24, и последовательность аминокислот, состоящую из SEQ ID NO: 25. Согласно некоторым вариантам реализации полипептид содержит последовательность аминокислот, состоящую из SEQ ID NO: 33, и последовательность аминокислот, состоящую из SEQ ID NO: 25. Согласно некоторым вариантам реализации полипептид содержит последовательность аминокислот, состоящую из SEQ ID NO: 55, и последовательность аминокислот, состоящую из SEQ ID NO: 25. Согласно некоторым вариантам реализации полипептид содержит последовательность аминокислот, состоящую из SEQ ID NO: 26, и последовательность аминокислот, состоящую из SEQ ID NO: 28. Согласно некоторым вариантам реализации полипептид содержит последовательность аминокислот, состоящую из SEQ ID NO: 27, и последовательность аминокислот, состоящую из SEQ ID NO: 28. Согласно некоторым вариантам реализации полипептид содержит последовательность аминокислот, состоящую из SEQ ID NO: 29, и последовательность аминокислот, состоящую из SEQ ID NO: 30. Согласно некоторым вариантам реализации полипептид содержит последовательность аминокислот, состоящую из SEQ ID NO: 34, и последовательность аминокислот, состоящую из SEQ ID NO: 30. Согласно некоторым вариантам реализации полипептид содержит последовательность аминокислот, состоящую из SEQ ID NO: 56, и последовательность аминокислот, состоящую из SEQ ID NO: 30.

Согласно некоторым вариантам реализации полипептид содержит одну, две, три, четыре, пять и/или шесть участков CDR антитела 313M26 или 313M32 (см. табл. 2 в настоящем документе). Согласно некоторым вариантам реализации полипептид содержит участки CDR, содержащие до четырех (т.е. 0, 1, 2, 3 или 4) замен аминокислот на каждый CDR. Согласно некоторым вариантам реализации указанный(ые) участок(участки) CDR тяжелых цепей входят в состав вариабельной области тяжелой цепи. Согласно некоторым вариантам реализации указанный(ые) участок(участки) CDR легких цепей входят в состав вариабельной области легкой цепи.

Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложен полипептид, который специфически связывает TIGIT, характеризующийся тем, что указанный полипептид содержит последовательность аминокислот, отличающуюся по меньшей мере приблизительно 80% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 63 или SEQ ID NO: 67, и/или последовательность аминокислот, отличающуюся по меньшей мере приблизительно 80% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 64 или SEQ ID NO: 68. Согласно некоторым вариантам реализации указанный полипептид содержит последовательность аминокислот, отличающуюся по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 97% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 63 или SEQ ID NO: 67. Согласно некоторым вариантам реализации указанный полипептид содержит последовательность аминокислот, отличающуюся по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 97% или по меньшей мере приблизительно 99% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 64 или SEQ ID NO: 68. Согласно некоторым вариантам реализации указанный полипептид содержит последовательность аминокислот, отличающуюся по меньшей мере приблизительно 95% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 63 или SEQ ID NO: 167 и/или последовательность аминокислот, отличающуюся по меньшей мере приблизительно 95% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 64 или SEQ ID NO: 68. Согласно некоторым вариантам реализации указанный полипептид содержит последовательность аминокислот, содержащую SEQ ID NO: 63, и/или последовательность аминокислот, содержащую SEQ ID NO: 64. Согласно некоторым вариантам реализации указанный полипептид содержит последовательность аминокислот, содержащую SEQ ID NO: 67, и/или последовательность аминокислот, содержащую SEQ ID NO: 68.

Согласно некоторым вариантам реализации полипептид содержит последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 82 и/или SEQ ID NO: 83. Согласно определению в настоящем документе, полипептид может быть получен в одноцепочечном виде или в виде двух или более ассоциированных цепей. Согласно некоторым вариантам реализации полипептид содержит последовательность аминокислот, содержащую SEQ ID NO: 63, и последовательность аминокислот, содержащую SEQ ID NO: 64. Согласно некоторым вариантам реализации полипептид содержит последовательность аминокислот, содержащую SEQ ID NO: 67, и последовательность аминокислот, содержащую SEQ ID NO: 68. Согласно некоторым вариантам реализации полипептид содержит последо-

вательность аминокислот, содержащую SEQ ID NO: 69, и последовательность аминокислот, содержащую SEQ ID NO: 71. Согласно некоторым вариантам реализации указанный полипептид содержит последовательность аминокислот, содержащую SEQ ID NO: 70, и последовательность аминокислот, содержащую SEQ ID NO: 72. Согласно некоторым вариантам реализации указанный полипептид содержит последовательность аминокислот, содержащую SEQ ID NO: 82, и последовательность аминокислот, содержащую SEQ ID NO: 72.

Согласно некоторым вариантам реализации полипептид содержит последовательность аминокислот, состоящую из SEQ ID NO: 63, и последовательность аминокислот, состоящую из SEQ ID NO: 64. Согласно некоторым вариантам реализации полипептид содержит последовательность аминокислот, состоящую из SEQ ID NO: 67, и последовательность аминокислот, состоящую из SEQ ID NO: 68. Согласно некоторым вариантам реализации полипептид содержит последовательность аминокислот, состоящую из SEQ ID NO: 69, и последовательность аминокислот, состоящую из SEQ ID NO: 71. Согласно некоторым вариантам реализации полипептид содержит последовательность аминокислот, состоящую из SEQ ID NO: 70, и последовательность аминокислот, состоящую из SEQ ID NO: 72. Согласно некоторым вариантам реализации полипептид содержит последовательность аминокислот, состоящую из SEQ ID NO: 82, и последовательность аминокислот, состоящую из SEQ ID NO: 72.

Многие белки, в том числе антитела, содержат сигнальную последовательность, которая направляет транспорт указанных белков в различные местоположения. Обычно сигнальные последовательности (также называемые сигнальными пептидами или лидерными последовательностями) локализованы на N-конце образующихся полипептидов. Они нацеливают полипептид в эндоплазматический ретикулум, и происходит сортировка белков с направлением по месту их назначения, например во внутреннее пространство органеллы, на внутреннюю мембрану, на внешнюю мембрану клетки или во внеклеточное пространство путем секреции. Большинство сигнальных последовательностей отщепляются от белка сигнальной пептидазой после транспорта белков в эндоплазматический ретикулум. Отщепление сигнальной последовательности от полипептида обычно происходит в специфическом сайте последовательности аминокислот и зависит от остатков аминокислот в составе сигнальной последовательности. Хотя, как правило, имеется один специфический сайт расщепления, сигнальная пептидаза может распознавать и/или может использовать более чем один сайт расщепления, что приводит к образованию негомогенных N-концов полипептида. Например, применение разных сайтов расщепления в составе сигнальной последовательности может приводить к экспрессии полипептида с разными N-концевыми аминокислотами. Соответственно, согласно некоторым вариантам реализации полипептиды согласно описанию в настоящем документе могут содержать смесь полипептидов с разными N-концами. Согласно некоторым вариантам реализации длина указанных N-концов отличается на 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислоты. Согласно некоторым вариантам реализации указанный полипептид по существу является гомогенным, т.е. полипептиды содержат одинаковый N-конец. Согласно некоторым вариантам реализации сигнальная последовательность полипептида содержит одну или более (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять и т.п.) замен аминокислот и/или делеций по сравнению с "природной" или "исходной" сигнальной последовательностью. Согласно некоторым вариантам реализации сигнальная последовательность полипептида содержит замены и/или делеции аминокислот, которые обеспечивают доминирование одного сайта расщепления, что приводит к образованию по существу гомогенного полипептида с одним N-концом. Согласно некоторым вариантам реализации сигнальная последовательность полипептида влияет на уровень экспрессии полипептида, например повышает экспрессию или снижает экспрессию.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело конкурирует за специфическое связывание с TIGIT со связывающим TIGIT агентом, описанным в настоящем документе.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело конкурирует за специфическое связывание с TIGIT со связывающим TIGIT агентом, содержащим: (a) CDR1 тяжелой цепи, содержащий GSSLSSSYMS (SEQ ID NO: 7) или GFSLSSSYMS (SEQ ID NO: 13), CDR2 тяжелой цепи, содержащий IIGSNGNTYYANWAKG (SEQ ID NO: 8), и CDR3 тяжелой цепи, содержащий GGYRTSGMDP (SEQ ID NO: 9) и (b) CDR1 легкой цепи, содержащий QASQSISSYLNW (SEQ ID NO: 10), QASQSNIYSDLAW (SEQ ID NO: 14) или QASQNIYSDLAW (SEQ ID NO: 81), CDR2 легкой цепи, содержащий DALKLAS (SEQ ID NO: 11) или RASTLAS (SEQ ID NO: 15), и CDR3 легкой цепи, содержащий QQEHSVGNVDN (SEQ ID NO: 12) или QQEHLVAWIYN (SEQ ID NO: 16).

Согласно некоторым вариантам реализации антитело конкурирует за специфическое связывание с TIGIT со связывающим TIGIT агентом, содержащим: (a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO: 32 и (b) вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 20. Согласно некоторым вариантам реализации антитело конкурирует за специфическое связывание с TIGIT со связывающим TIGIT агентом, содержащим вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 17, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 18. Согласно некоторым вариантам реализации антитело конкурирует за специфическое связывание с TIGIT со связывающим TIGIT агентом, содержащим вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 19, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 20. Согласно некоторым вариантам реализации антитело конкурирует за специфическое связывание с TIGIT

со связывающим TIGIT агентом, содержащим вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 32, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 20.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело конкурирует за специфическое связывание с TIGIT со связывающим TIGIT агентом, содержащим тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 34 или SEQ ID NO: 56, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 28 или SEQ ID NO: 30. Согласно некоторым вариантам реализации антитело конкурирует за специфическое связывание с TIGIT со связывающим TIGIT агентом, содержащим тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 26, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 28. Согласно некоторым вариантам реализации антитело конкурирует за специфическое связывание с TIGIT со связывающим TIGIT агентом, содержащим тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 27, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 28. Согласно некоторым вариантам реализации антитело конкурирует за специфическое связывание с TIGIT со связывающим TIGIT агентом, содержащим тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 29, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 30. Согласно некоторым вариантам реализации антитело конкурирует за специфическое связывание с TIGIT со связывающим TIGIT агентом, содержащим тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 34, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 30. Согласно некоторым вариантам реализации антитело конкурирует за специфическое связывание с TIGIT со связывающим TIGIT агентом, содержащим тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 56, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 30.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело конкурирует с антителом 313R11 за специфическое связывание с TIGIT. Согласно некоторым вариантам реализации антитело конкурирует с антителом 313R12 за специфическое связывание с TIGIT. Согласно некоторым вариантам реализации антитело конкурирует с антителом 313R14 за специфическое связывание с TIGIT человека. Согласно некоторым вариантам реализации антитело конкурирует с антителом 313R19 за специфическое связывание с TIGIT человека. Согласно некоторым вариантам реализации антитело конкурирует с антителом 313R20 за специфическое связывание с TIGIT человека.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело конкурирует с референсным антителом за специфическое связывание с TIGIT, при этом указанное референсное антитело представляет собой антитело 313R11. Согласно некоторым вариантам реализации антитело конкурирует с референсным антителом за специфическое связывание с TIGIT, при этом указанное референсное антитело представляет собой антитело 313R12. Согласно некоторым вариантам реализации антитело конкурирует с референсным антителом за специфическое связывание с TIGIT, при этом указанное референсное антитело представляет собой антитело 313R14. Согласно некоторым вариантам реализации антитело конкурирует с референсным антителом за специфическое связывание с TIGIT, при этом указанное референсное антитело представляет собой антитело 313R19. Согласно некоторым вариантам реализации антитело конкурирует с референсным антителом за специфическое связывание с TIGIT, при этом указанное референсное антитело представляет собой антитело 313R20.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело связывает тот же эпитоп или по существу тот же эпитоп на TIGIT, что и связывающий TIGIT агент согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам реализации антитело связывает тот же эпитоп или по существу тот же эпитоп на TIGIT, что и антитело 313R11. Согласно некоторым вариантам реализации антитело связывает тот же эпитоп или по существу тот же эпитоп на TIGIT, что и антитело 313R12. Согласно некоторым вариантам реализации антитело связывает тот же эпитоп или по существу тот же эпитоп на TIGIT, что и антитело 313R14. Согласно некоторым вариантам реализации антитело связывает тот же эпитоп или по существу тот же эпитоп на TIGIT, что и антитело 313R19. Согласно некоторым вариантам реализации антитело связывает тот же эпитоп или по существу тот же эпитоп на TIGIT, что и антитело 313R20.

Согласно другому варианту реализации антитело связывает эпитоп на TIGIT, перекрывающийся с эпитопом на TIGIT, который связывает связывающий TIGIT агент согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело связывает эпитоп на TIGIT, перекрывающийся с эпитопом на TIGIT, который связывает антитело 313R11. Согласно другому варианту реализации указанное антитело связывает эпитоп на TIGIT, перекрывающийся с эпитопом на TIGIT, который связывает антитело 313R12. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело связывает эпитоп на TIGIT, перекрывающийся с эпитопом на TIGIT, который связывает антитело 313R14. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело связывает эпитоп на TIGIT, перекрывающийся с эпитопом на TIGIT, который связывает антитело 313R19. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело связывает эпитоп на TIGIT, перекрывающийся с эпитопом на TIGIT, который связывает антитело 313R20.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело конкурирует за специфическое связывание с TIGIT со связывающим TIGIT агентом, описанным в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации антитело конкурирует за специфическое связывание с TIGIT со связывающим TIGIT агентом, содержащим: (a) CDR1 тяжелой цепи, содержащий TSDYAWN (SEQ ID NO: 57), CDR2 тяжелой цепи, содержащий YISYSGSTSYNPSLRS (SEQ ID NO: 58), и CDR3 тяжелой цепи, содержащий ARRQVGLGFAY (SEQ ID NO: 59) и (b) CDR1 легкой цепи, содержащий KASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 60), CDR2 легкой цепи, содержащий SASYRYT (SEQ ID NO: 61), и CDR3 легкой цепи, содержащий

QQHYSTP (SEQ ID NO: 62).

Согласно некоторым вариантам реализации антитело конкурирует за специфическое связывание с TIGIT со связывающим TIGIT агентом, содержащим (a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 63 или SEQ ID NO: 67 и (b) вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 64 или SEQ ID NO: 68. Согласно некоторым вариантам реализации антитело конкурирует за специфическое связывание с TIGIT со связывающим TIGIT агентом, содержащим вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 63, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 64. Согласно некоторым вариантам реализации антитело конкурирует за специфическое связывание с TIGIT со связывающим TIGIT агентом, содержащим вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 167, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 68. Согласно некоторым вариантам реализации антитело конкурирует за специфическое связывание с TIGIT со связывающим TIGIT агентом, содержащим тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 70, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 72. Согласно некоторым вариантам реализации антитело конкурирует за специфическое связывание с TIGIT со связывающим TIGIT агентом, содержащим тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 82, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 72.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело конкурирует с антителом 313M26 за специфическое связывание с TIGIT. Согласно некоторым вариантам реализации антитело конкурирует с антителом 313M32 за специфическое связывание с TIGIT. Согласно некоторым вариантам реализации антитело конкурирует с антителом 313M32 за специфическое связывание с TIGIT человека. Согласно некоторым вариантам реализации антитело конкурирует с референсным антителом за специфическое связывание с TIGIT, при этом указанное референсное антитело представляет собой антитело 313M26. Согласно некоторым вариантам реализации антитело конкурирует с референсным антителом за специфическое связывание с TIGIT, при этом указанное референсное антитело представляет собой антитело 313M32. Согласно некоторым вариантам реализации антитело конкурирует с референсным антителом за специфическое связывание с TIGIT, при этом указанное референсное антитело представляет собой антитело 313M33. Согласно некоторым вариантам реализации антитело конкурирует с референсным антителом за специфическое связывание с TIGIT человека, при этом указанное референсное антитело представляет собой антитело 313M32. Согласно некоторым вариантам реализации антитело конкурирует с референсным антителом за специфическое связывание с TIGIT человека, при этом указанное референсное антитело представляет собой антитело 313M33.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело связывает тот же эпитоп или по существу тот же эпитоп на TIGIT, что и связывающий TIGIT агент, описанный в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации антитело связывает тот же эпитоп или по существу тот же эпитоп на TIGIT, что и антитело 313M26. Согласно некоторым вариантам реализации антитело связывает тот же эпитоп или по существу тот же эпитоп на TIGIT, что и антитело 313M32. Согласно некоторым вариантам реализации антитело связывает тот же эпитоп или по существу тот же эпитоп на TIGIT, что и антитело 313M33. Согласно некоторым вариантам реализации антитело связывает тот же эпитоп или по существу тот же эпитоп на TIGIT человека, что и антитело 313M32. Согласно некоторым вариантам реализации антитело связывает тот же эпитоп или по существу тот же эпитоп на TIGIT человека, что и антитело 313M33.

Согласно другому варианту реализации антитело связывает эпитоп на TIGIT, перекрывающийся с эпитопом на TIGIT, который связывает связывающий TIGIT агент, описанный в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело связывает эпитоп на TIGIT, перекрывающийся с эпитопом на TIGIT, который связывает антитело 313M26. Согласно другому варианту реализации указанное антитело связывает эпитоп на TIGIT, перекрывающийся с эпитопом на TIGIT, который связывает антитело 313M32. Согласно другому варианту реализации указанное антитело связывает эпитоп на TIGIT, перекрывающийся с эпитопом на TIGIT, который связывает антитело 313M33. Согласно другому варианту реализации указанное антитело связывает эпитоп на TIGIT, перекрывающийся с эпитопом на TIGIT человека, который связывает антитело 313M32. Согласно другому варианту реализации указанное антитело связывает эпитоп на TIGIT, перекрывающийся с эпитопом на TIGIT человека, который связывает антитело 313M33.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело конкурирует за связывание с эпитопом, содержащим аминокислоты, входящие в состав последовательности SEQ ID NO: 79, со связывающим TIGIT агентом, описанным в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации антитело конкурирует за связывание с эпитопом, содержащим аминокислоты, входящие в состав последовательности SEQ ID NO: 80, со связывающим TIGIT агентом, описанным в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации антитело конкурирует за связывание с эпитопом, содержащим аминокислоты, входящие в состав последовательностей SEQ ID NO: 79 и SEQ ID NO: 80, со связывающим TIGIT агентом, описанным в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации антитело конкурирует за связывание с эпитопом, содержащим аминокислоты Q62 и I109 последовательности SEQ ID NO: 4, со связывающим TIGIT агентом, описанным в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации антитело конкурирует за связывание с эпитопом, содержащим аминокислоты Q62 и

T119 последовательности SEQ ID NO: 4, со связывающим TIGIT агентом, описанным в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации антитело конкурирует за связывание с эпитопом, содержащим аминокислоты Q64 и I109 последовательности SEQ ID NO: 4, со связывающим TIGIT агентом, описанным в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации антитело конкурирует за связывание с эпитопом, содержащим аминокислоты Q64 и T119 последовательности SEQ ID NO: 4, со связывающим TIGIT агентом, описанным в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации антитело конкурирует за связывание с эпитопом, содержащим аминокислоты Q62, Q64 и I109 последовательности SEQ ID NO: 4, со связывающим TIGIT агентом, описанным в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации антитело конкурирует за связывание с эпитопом, содержащим аминокислоты Q62, Q64 и T119 последовательности SEQ ID NO: 4, со связывающим TIGIT агентом, описанным в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации антитело конкурирует за связывание с эпитопом, содержащим аминокислоты Q62, I109 и T119 последовательности SEQ ID NO: 4, со связывающим TIGIT агентом, описанным в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации антитело конкурирует за связывание с эпитопом, содержащим аминокислоты Q64, I109 и T119 последовательности SEQ ID NO: 4, со связывающим TIGIT агентом, описанным в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации антитело конкурирует за связывание с эпитопом, содержащим аминокислоты Q62, Q64, I109 и T119 последовательности SEQ ID NO: 4, со связывающим TIGIT агентом, описанным в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации антитело конкурирует за связывание с эпитопом, содержащим по меньшей мере одну аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из: N58, E60, Q62, Q64, L65, F107, I109, H111, T117, T119, G120 и R121 последовательности SEQ ID NO: 4, со связывающим TIGIT агентом, описанным в настоящем документе.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент (например, антитело), описанный в настоящем документе, связывает TIGIT и модулирует активность TIGIT. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой антагонист TIGIT и снижает активность TIGIT. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент ингибирует активность TIGIT по меньшей мере приблизительно на 10%, по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 30%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 75%, по меньшей мере приблизительно на 90% или приблизительно на 100%. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент, который ингибирует активность TIGIT, представляет собой антитело 313R11, антитело 313R12, антитело 313R14, антитело 313R19 или антитело 313R20. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент, который ингибирует активность TIGIT человека, представляет собой гуманизированную версию антитела 313R11, антитела 313R12, антитела 313R14, антитела 313R19 или антитела 313R20. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент, который ингибирует активность TIGIT, представляет собой антитело 313M26 или антитело 313M32. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент, который ингибирует активность TIGIT человека, представляет собой гуманизированную версию антитела 313M26 (например, антитело 313M32). Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент, который ингибирует активность TIGIT, представляет собой антитело 313M32.

Согласно некоторым вариантам реализации связывающие TIGIT агенты, описанные в настоящем документе, связывают TIGIT и ингибируют или снижают сигнализацию TIGIT. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент (например, антитело) ингибирует сигнализацию TIGIT по меньшей мере приблизительно на 10%, по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 30%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 75%, по меньшей мере приблизительно на 90% или приблизительно на 100%. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент ингибирует мышь сигнализацию TIGIT. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент ингибирует сигнализацию TIGIT человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент ингибирует сигнализацию TIGIT человека и мыши. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент, который ингибирует сигнализацию TIGIT, представляет собой антитело 313R11, антитело 313R12, антитело 313R14, антитело 313R19 или антитело 313R20. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент, который ингибирует сигнализацию TIGIT, представляет собой антитело 313M26 или антитело 313M32. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент, который ингибирует сигнализацию TIGIT, представляет собой антитело 313M32.

Фосфорилирование цитоплазматического "хвоста" TIGIT происходит после взаимодействия с его контррецептором PVR. Фосфорилирование TIGIT представляет собой начало каскада, который включает нижестоящие события, влияющие на другие известные сигнальные пути. Соответственно, оценка фосфорилирования TIGIT может обеспечивать информацию об активности TIGIT и сигнализации TIGIT.

Анализы фосфорилирования известны специалистам в данной области техники и широко применяются для мониторинга активации белков и/или активации путей. Указанные анализы могут применяться для мониторинга эффекта различных вариантов лечения на активацию целевого белка и/или целевого пути. Например, анализ фосфорилирования in vitro может применяться для оценки эффекта антагониста

TIGIT на индуцированную PVR активацию TIGIT.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент (например, антитело) ингибирует связывание TIGIT с рецептором. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент ингибирует связывание TIGIT с PVR. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент ингибирует связывание TIGIT с PVR-L2, PVR-L3 и/или PVR-L4. Согласно некоторым вариантам реализации указанное ингибирование связывания связывающего TIGIT агента с PVR составляет по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно на 25%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 75%, по меньшей мере приблизительно на 90% или по меньшей мере приблизительно 95%. Согласно некоторым вариантам реализации указанное ингибирование связывания связывающего TIGIT агента с PVR-L2, PVR-L3 и/или PVR-L4, составляет по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно на 25%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 75%, по меньшей мере приблизительно на 90% или по меньшей мере приблизительно 95%. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент, который ингибирует связывание TIGIT с PVR, представляет собой антитело 313R11, антитело 313R12, антитело 313R14, антитело 313R19 или антитело 313R20. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент, который ингибирует связывание TIGIT с PVR-L2, PVR-L3 и/или PVR-L4, представляет собой антитело 313R11, антитело 313R12, антитело 313R14, антитело 313R19 или антитело 313R20. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент, который ингибирует связывание TIGIT с PVR, представляет собой антитело 313M26 или антитело 313M32. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент, который ингибирует связывание TIGIT с PVR, представляет собой антитело 313M32. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент, который ингибирует связывание TIGIT с PVR-L2, PVR-L3 и/или PVR-L4, представляет собой антитело 313M26 или антитело 313M32. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент, который ингибирует связывание TIGIT с PVR-L2, PVR-L3 и/или PVR-L4, представляет собой антитело 313M32.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент (например, антитело) блокирует связывание TIGIT с рецептором. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент блокирует связывание TIGIT с PVR. Согласно некоторым вариантам реализации указанное блокирование связывания с PVR связывающим TIGIT агентом составляет по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно на 25%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 75%, по меньшей мере приблизительно на 90% или по меньшей мере приблизительно 95%. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент блокирует связывание TIGIT с PVR-L2, PVR-L3 и/или PVR-L4. Согласно некоторым вариантам реализации происходит блокирование связывания связывающим TIGIT агентом с PVR-L2, PVR-L3 и/или PVR-L4 по меньшей мере приблизительно на 10%, по меньшей мере приблизительно на 25%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 75%, по меньшей мере приблизительно на 90% или по меньшей мере приблизительно на 95%. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент, который блокирует связывание TIGIT с PVR, представляет собой антитело 313R11, антитело 313R12, антитело 313R14, антитело 313R19 или антитело 313R20. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент, который блокирует связывание TIGIT с PVR-L2, PVR-L3 и/или PVR-L4, представляет собой антитело 313R11, антитело 313R12, антитело 313R14, антитело 313R19 или антитело 313R20. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент, который блокирует связывание TIGIT с PVR, представляет собой антитело 313M26 или антитело 313M32. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент, который блокирует связывание TIGIT с PVR, представляет собой антитело 313M32. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент, который блокирует связывание TIGIT с PVR-L2, PVR-L3 и/или PVR-L4, представляет собой антитело 313M26 или антитело 313M32. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент, который блокирует связывание TIGIT с PVR-L2, PVR-L3 и/или PVR-L4, представляет собой антитело 313M32.

Анализы связывания известны специалистам в данной области техники и описаны в настоящем документе. Анализы связывания могут применяться для мониторинга эффекта тестируемого агента на взаимодействие между целевым белком и партнером указанного белка для связывания (например, рецептором или лигандом). Например, анализ связывания in vitro может применяться для оценки того, блокирует ли антагонист TIGIT взаимодействие TIGIT с PVR.

Согласно некоторым вариантам реализации связывающие TIGIT агенты, описанные в настоящем документе, оказывают один или более из следующих эффектов: ингибируют пролиферацию опухолевых клеток, ингибируют рост опухоли, снижают туморогенность опухоли, снижают туморогенность опухоли за счет уменьшения частоты встречаемости раковых стволовых клеток в опухоли, запускают клеточную смерть опухолевых клеток, усиливают или дополнительно стимулируют иммунный ответ, усиливают или дополнительно стимулируют противоопухолевый ответ, повышают цитолитическую активность иммунных клеток, повышают киллинг опухолевых клеток, повышают киллинг опухолевых клеток иммунными клетками, индуцируют дифференцировку клеток в опухоли, дифференцировку туморогенных кле-

ток в клетки с нетуморогенным статусом, индуцируют экспрессию маркеров дифференцировки в опухолевых клетках, предотвращают метастазирование опухолевых клеток, уменьшают выживание опухолевых клеток, увеличивают зависимое от клеточных контактов ингибирование роста, увеличивают апоптоз опухолевых клеток, снижают эпителиально-мезенхимальный переход (EMT) или уменьшают выживание опухолевых клеток. Согласно некоторым вариантам реализации указанные агенты оказывают один или более из следующих эффектов: ингибируют вирусную инфекцию, ингибируют хроническую вирусную инфекцию, снижают вирусную нагрузку, запускают клеточную смерть инфицированных вирусами клеток, или снижают число или процент инфицированных вирусами клеток.

Согласно некоторым вариантам реализации связывающие TIGIT агенты, описанные в настоящем документе, ингибируют рост опухоли. Согласно некоторым вариантам реализации указанные связывающие TIGIT агенты ингибируют рост опухоли in vivo (например, в модели на мышах, и/или у человека, больного раком). Согласно некоторым вариантам реализации рост опухоли ингибирован по меньшей мере приблизительно 2-кратно, приблизительно 3-кратно, приблизительно 5-кратно, приблизительно 10-кратно, приблизительно 50-кратно, приблизительно 100-кратно или приблизительно 1000-кратно по сравнению с не подвергавшейся лечению опухоли.

Согласно некоторым вариантам реализации связывающие TIGIT агенты, описанные в настоящем документе, снижают туморогенность опухоли. Согласно некоторым вариантам реализации указанные связывающие TIGIT агенты снижают туморогенность опухоли в модели на животных, например, в модели на мышах. Согласно некоторым вариантам реализации указанная модель на мышах представляет собой модель ксенотрансплантата на мышах. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент не связывает TIGIT мыши и неэффективен в модели на мышах. Согласно некоторым вариантам реализации суррогатный связывающий TIGIT агент, который связывает TIGIT мыши, применяют в модели на мышах. Согласно некоторым вариантам реализации указанные связывающие TIGIT агенты снижают туморогенность опухоли, содержащей раковые стволовые клетки, в модели на животных, например, в модели на мышах. Согласно некоторым вариантам реализации число или частота раковых стволовых клеток в опухоли снижается по меньшей мере приблизительно 2-кратно, приблизительно 3-кратно, приблизительно 5-кратно, приблизительно 10-кратно, приблизительно 50-кратно, приблизительно 100-кратно или приблизительно 1000-кратно. Согласно некоторым вариантам реализации снижение числа или частоты встречаемости раковых стволовых клеток определяют путем анализа методом серийных разведений с применением модели на животных. Дополнительные примеры и указания по применению анализов с применением серийных разведений для определения снижения числа или частоты встречаемости раковых стволовых клеток в опухоли можно найти, например, в международной публикации WO 2008/042236; патентной публикации США № 2008/0064049; и патентной публикации США № 2008/0178305.

Согласно некоторым вариантам реализации указанные агенты (например, полипептиды и/или антитела), описанные в настоящем документе, связывают TIGIT и модулируют иммунный ответ. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент, описанный в настоящем документе, активирует и/или повышает иммунный ответ. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент повышает клеточный иммунитет, стимулирует клеточный иммунитет или усиливает клеточный иммунитет. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент повышает врожденный клеточный иммунитет, стимулирует врожденный клеточный иммунитет или усиливает врожденный клеточный иммунитет. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент повышает адаптивный клеточный иммунитет, стимулирует адаптивный клеточный иммунитет или усиливает адаптивный клеточный иммунитет. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент повышает Т-клеточную активность, стимулирует Т-клеточную активность или усиливает Т-клеточную активность. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент повышает цитолитическую Т-клеточную (CTL) активность, стимулирует цитолитическую Т-клеточную (CTL) активность или усиливает цитолитическую Т-клеточную (CTL) активность. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент повышает активность, стимулирует активность или усиливает активность NK-клеток. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент повышает активность, стимулирует активность или усиливает активность лимфокин-активируемых клеток-киллеров (LAK). Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент повышает активность, стимулирует активность или усиливает активность инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIF). Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент ингибирует или снижает активность клеток Treg. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент ингибирует или снижает активность СКМП. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент повышает киллинг опухолевых клеток, стимулирует киллинг опухолевых клеток или усиливает киллинг опухолевых клеток. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент увеличивает ингибирование, стимулирует ингибирование или усиливает ингибирование роста опухоли.

Согласно некоторым вариантам реализации агент, описанный в настоящем документе, представляет собой антагонист TIGIT человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент представляет собой антагонист TIGIT и активирует и/или повышает иммунный ответ. Согласно некоторым

вариантам реализации указанный агент представляет собой антагонист TIGIT и активирует и/или повышает активность NK-клеток. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент повышает указанную активность по меньшей мере приблизительно на 10%, по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 30%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 75%, по меньшей мере приблизительно на 90% или приблизительно на 100%. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент представляет собой антагонист TIGIT, и активирует Т-клетки и/или повышает активность Т-клеток (например, цитолитическую активность Т-клеток). Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент повышает указанную активность по меньшей мере приблизительно на 10%, по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 30%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 75%, по меньшей мере приблизительно на 90% или приблизительно на 100%. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент представляет собой антагонист TIGIT и индуцирует и/или усиливает иммунный ответ Th1-типа. В общем случае, иммунный ответ Th1-типа включает продуцирование интерферона-гамма (ИФН-γ), ИЛ-2 и фактора некроза опухоли-бета (ФНО-β). В отличие от иммунного ответа Th1-типа, иммунный ответ Th2-типа обычно включает продуцирование ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-9, ИЛ-10 и ИЛ-13. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент представляет собой антагонист TIGIT, и индуцирует и/или увеличивает продуцирование цитокинов или лимфокинов. Согласно некоторым вариантам реализации указанная индукция и/или увеличение продуцирования цитокинов или лимфокинов может представлять собой непрямой эффект.

Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент, описанный в настоящем документе, увеличивает активацию NK-клеток. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент увеличивает активацию Т-клеток. Согласно некоторым вариантам реализации указанный активация NK-клеток и/или Т-клеток связывающим TIGIT агентом приводит к увеличению уровня активации NK-клеток и/или Т-клеток по меньшей мере приблизительно на 10%, по меньшей мере приблизительно на 25%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 75%, по меньшей мере приблизительно на 90% или по меньшей мере приблизительно на 95%. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент, который увеличивает активацию NK-клеток, представляет собой антитело 313R11, антитело 313R12, антитело 313R14, антитело 313R19 или антитело 313R20. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент, который увеличивает активацию NK-клеток, представляет собой антитело 313M26 или антитело 313M32. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент, который увеличивает активацию NK-клеток, представляет собой антитело 313M32.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент (например, антитело) представляет собой антагонист активности регуляторных Т-клеток (Treg). Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент, описанный в настоящем документе, ингибирует или снижает активность клеток Treg. Согласно некоторым вариантам реализации ингибирование активности клеток Treg связывающим TIGIT агентом приводит к ингибированию супрессорной активности клетки Treg по меньшей мере приблизительно на 10%, по меньшей мере приблизительно на 25%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 75%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95% или приблизительно на 100%. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент, который ингибирует активность Treg, представляет собой антитело 313R11, антитело 313R12, антитело 313R14, антитело 313R19 или антитело 313R20. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент, который ингибирует активность Treg, представляет собой антитело 313M26 или антитело 313M32. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент, который ингибирует активность Treg, представляет собой антитело 313M32.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент (например, антитело) представляет собой антагонист супрессорных клеток миелоидного происхождения (клеток СКМП). Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент ингибирует активность СКМП. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент ингибирует активность СКМП по меньшей мере приблизительно на 10%, по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 30%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 75%, по меньшей мере приблизительно на 90% или приблизительно на 100%. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент, который ингибирует активность СКМП, представляет собой антитело 313R11, антитело 313R12, антитело 313R14, антитело 313R19 или антитело 313R20. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент, который ингибирует активность СКМП, представляет собой антитело 313M26 или антитело 313M32. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент, который ингибирует активность СКМП, представляет собой антитело 313M32.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент (например, антитело) повышает активность естественных клеток-киллеров (NK). Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент повышает активность NK-клеток по меньшей мере прибли-

зительно на 10%, по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 30%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 75%, по меньшей мере приблизительно на 90% или приблизительно на 100%. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент, который повышает активность NK-клеток, представляет собой антитело 313R11, антитело 313R12, антитело 313R14, антитело 313R19 или антитело 313R20. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент, который повышает активность NK-клеток, представляет собой антитело 313M26 или антитело 313M32. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент, который повышает активность NK-клеток, представляет собой антитело 313M32.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент (например, антитело) повышает активность инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL). Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент повышает активность TIL по меньшей мере приблизительно на 10%, по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 30%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 75%, по меньшей мере приблизительно на 90% или приблизительно на 100%. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент, который повышает активность клеток TIL, представляет собой антитело 313R11, антитело 313R12, антитело 313R14, антитело 313R19 или антитело 313R20. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент, который повышает активность клеток TIL, представляет собой антитело 313M26 или антитело 313M32. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент, который повышает активность клеток TIL, представляет собой антитело 313M32.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент (например, антитело) повышает или усиливает активность активируемых лимфокинами клеток-киллеров (LAK). Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент повышает активность LAK по меньшей мере приблизительно на 10%, по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 30%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 75%, по меньшей мере приблизительно на 90% или приблизительно на 100%. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент, который повышает активность клеток LAK, представляет собой антитело 313R11, антитело 313R12, антитело 313R14, антитело 313R19 или антитело 313R20. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент, который повышает активность клеток LAK, представляет собой антитело 313M26 или антитело 313M32. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент, который повышает активность клеток LAK, представляет собой антитело 313M32.

In vivo и in vitro анализы для определения того, модулирует ли связывающий TIGIT агент (или кандидатный связывающий агент) иммунный ответ, известны в данной области техники или находятся в процессе разработки. Согласно некоторым вариантам реализации может применяться функциональный анализ, который обеспечивает детекцию активации Т-клеток. Согласно некоторым вариантам реализации может применяться функциональный анализ, который обеспечивает детекцию пролиферации Т-клеток. Согласно некоторым вариантам реализации может применяться функциональный анализ, который обеспечивает детекцию NK-активности. Согласно некоторым вариантам реализации может применяться функциональный анализ, который обеспечивает детекцию CTL-активности. Согласно некоторым вариантам реализации может применяться функциональный анализ, который обеспечивает детекцию активности Treg. Согласно некоторым вариантам реализации может применяться функциональный анализ, который обеспечивает детекцию активности СКМП. Согласно некоторым вариантам реализации может применяться функциональный анализ, который обеспечивает детекцию продуцирования цитокинов или лимфокинов, или клеток, продуцирующих цитокины или лимфокины. Согласно некоторым вариантам реализации применяют анализ ELISpot для измерения частоты встречаемости антиген-специфических Т-клеток. Согласно некоторым вариантам реализации анализ ELISpot применяют для измерения высвобождения/продуцирования цитокинов и/или для измерения числа продуцирующих цитокины клеток. Согласно некоторым вариантам реализации анализы на цитокины применяют для идентификации ответа Th1-типа. Согласно некоторым вариантам реализации анализы на цитокины применяют для идентификации ответа Th2-типа. Согласно некоторым вариантам реализации цитокин анализы применяют для идентификации ответа Th17-типа. Согласно некоторым вариантам реализации FACS-анализ применяют для измерения маркеров активации на иммунных клетках, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, Т-клетках, В-клетках, NK-клетках, макрофагах и/или миелоидных клетках.

Согласно некоторым вариантам реализации связывающие TIGIT агенты, описанные в настоящем документе, имеют время полужизни в кровотоке у мышей, крыс, яванского макака или человека, составляющее по меньшей мере приблизительно 2 ч, по меньшей мере приблизительно 5 ч, по меньшей мере приблизительно 10 ч, по меньшей мере приблизительно 24 ч, по меньшей мере приблизительно 3 дня, по меньшей мере приблизительно 1 неделю или по меньшей мере приблизительно 2 недели. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой IgG (например, IgG1, IgG2 или IgG4) антитело, которое имеет время полужизни в кровотоке у мышей, яванского макака или человека, составляющее по меньшей мере приблизительно 2 ч, по меньшей мере приблизительно 5 ч, по меньшей мере приблизительно 10 ч, по меньшей мере приблизительно 24 ч, по меньшей мере прибли-

зительно 3 дня, по меньшей мере приблизительно 1 неделю или по меньшей мере приблизительно 2 недели. Способы увеличения (или уменьшения) времени полужизни агентов, таких как полипептиды и антитела, известны в данной области техники. Например, известные способы увеличения времени полужизни в кровотоке антител IgG включают введение в Fc-область мутаций, которые увеличивают pH-зависимое связывание антитела с неонатальным Fc-рецептором (FcRn) при pH 6,0. Известные способы увеличения времени полужизни в кровотоке фрагментов антител без Fc-области включают такие техники, как пегилирование.

Согласно некоторым вариантам реализации, описанным в настоящем документе, связывающие TIGIT агенты представляют собой полипептиды. Согласно некоторым вариантам реализации указанный полипептиды представляют собой рекомбинантные полипептиды, естественные полипептиды или синтетические полипептиды, содержащие антитело или его фрагмент, которые связывают TIGIT. В данной области техники известно, что некоторые последовательности аминокислот согласно настоящему изобретению могут варьировать без значимого эффекта на структуру или функцию белка. Соответственно, настоящее изобретение дополнительно включает варианты полипептидов, которые демонстрируют значимую активность, или включают области антитела или его фрагмента, которое(ый) связывает TIGIT. Согласно некоторым вариантам реализации варианты последовательностей аминокислот связывающих TIGIT полипептидов включают делеции, встраивания, инверсии, повторы и/или другие типы замен.

Указанные полипептиды, их аналоги и варианты могут быть дополнительно модифицированы таким образом, чтобы включать дополнительные химические фрагменты, обычно не входящие в состав полипептида. Указанные дериватизированные фрагменты могут улучшать или иным образом модулировать растворимость, биологическое время полужизни и/или абсорбцию полипептида. Указанные фрагменты могут также снижать или устранять нежелательные побочные эффекты указанных полипептидов и их вариантов. Обзор химических фрагментов можно найти в источнике: Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22st Edition, 2012, Pharmaceutical Press, London.

Согласно некоторым вариантам реализации полипептиды, описанные в настоящем документе являются выделенными. Согласно некоторым вариантам реализации полипептиды, описанные в настоящем документе, являются по существу выделенными.

Полипептиды, описанные в настоящем документе, могут быть получены любым подходящим способом, известным в данной области техники. Такие способы варьируют от способов прямого белкового синтеза до конструирования последовательности ДНК, кодирующей последовательности полипептидов, и экспрессии указанных последовательностей у подходящего хозяина. Согласно некоторым вариантам реализации последовательность ДНК конструируют с применением рекомбинантной технологии путем выделения или синтеза последовательности ДНК, кодирующей представляющий интерес белок дикого типа. Необязательно, указанная последовательность может быть подвергнута мутагенезу с применением сайт-специфического мутагенеза для получения ее функциональных аналогов.

Согласно некоторым вариантам реализации последовательность ДНК, кодирующая представляющий интерес полипептид, может быть сконструирована путем химического синтеза с применением синтезатора олигонуклеотидов. Олигонуклеотиды могут быть разработаны на основании последовательности аминокислот требуемого полипептида и выбора кодонов, предпочтительных для клетки-хозяина, в которой предполагается продуцировать представляющий интерес рекомбинантный полипептид. Стандартные способы могут применяться для синтеза последовательности полинуклеотидов, кодирующей выделенный представляющий интерес полипептид. Например, полная последовательность аминокислот может применяться для конструирования получаемого обратной трансляцией гена. Кроме того, может быть синтезирован олигомер ДНК, содержащий последовательность нуклеотидов, кодирующую конкретный выделенный полипептид. Например, могут быть синтезированы и затем лигированы несколько небольших олигонуклеотидов, кодирующих части требуемого полипептида. Индивидуальные олигонуклеотиды, как правило, содержат липкие 5'- или 3'-концы для комплементарной сборки.

После сборки (путем синтеза, сайт-специфического мутагенеза или другого способа) последовательности полинуклеотидов, кодирующий представляющий интерес конкретный полипептид, могут быть встроены в экспрессионный вектор и функционально связаны с последовательностью контроля экспрессии, подходящей для экспрессии белка у требуемого хозяина. Надлежащая сборка может быть подтверждена путем секвенирования нуклеотидов, ферментативное рестрикционное картирование и/или экспрессия биологически активного полипептида у подходящего хозяина. Как хорошо известно в данной области техники, для получения высоких уровней экспрессии трансфицированного гена у хозяина указанный ген должен быть функционально связан с транскрипционными и трансляционными последовательностями контроля экспрессии, функциональными у выбранного экспрессионного хозяина.

Согласно некоторым вариантам реализации рекомбинантные экспрессионные векторы применяют для амплификации и экспрессии ДНК, кодирующей антитела против TIGIT человека или их фрагменты. Например, рекомбинантные экспрессионные векторы могут представлять собой реплицируемые ДНК-конструкции, содержащие синтетические или происходящие из кДНК фрагменты ДНК, кодирующие полипептидную цепь связывающего TIGIT агента, такие как антитело против TIGIT или его фрагмент, функционально связанного с подходящими транскрипционными и/или трансляционными регуляторными

элементами, происходящими из генов млекопитающих, микроорганизмов, вирусов или насекомых. Транскрипционная единица обычно содержит совокупность следующих последовательностей: (1) генетический элемент или элементы, играющие регуляторную роль в генной экспрессии, например промоторы или энхансеры транскрипции, (2) структурную или кодирующую последовательность, которая транскрибируется в мРНК и транслируется в белок, и (3) подходящие последовательности инициации и терминации транскрипции и трансляции. Регуляторные элементы могут включать последовательность оператора для контроля транскрипции. Дополнительно может быть включена способность к репликации у хозяина, обычно обеспечиваемая точкой начала репликации, и ген для селекции для облегчения распознавания трансформантов. Области ДНК "функционально связаны", если они имеют функциональное отношение друг к другу. Например, ДНК сигнального пептида (секреторного лидера) функционально связана с ДНК полипептида, если он экспрессируется в виде предшественника, который принимает участие в секреции полипептида; промотор функционально связан с кодирующей последовательностью, если он контролирует транскрипцию указанной последовательности; или сайт связывания рибосомы функционально связан с кодирующей последовательностью, если он расположен таким образом, чтобы позволять трансляцию. Согласно некоторым вариантам реализации структурные элементы, предназначенные для применения в дрожжевых экспрессионных системах, включают лидерную последовательность, обеспечивающую внеклеточную секрецию транслированного белка клеткой-хозяином. Согласно другим вариантам реализации в тех ситуациях, когда рекомбинантный белок экспрессируется без лидерной или транспортной последовательности, он может включать N-концевой остаток метионина. Затем указанный остаток может необязательно быть отщеплен от экспрессированного рекомбинантного белка для получения конечного продукта.

Выбор последовательности контроля экспрессии и экспрессионного вектора зависит от выбора хозяина. Может применяться широкий спектр комбинаций экспрессионных хозяев/векторов. Подходящие для эукариотических хозяев экспрессионные векторы включают, например, векторы, содержащие последовательности контроля экспрессии из SV40, вируса папилломы крупного рогатого скота, аденовируса и цитомегаловируса. Подходящие для бактериальных хозяев экспрессионные векторы включают известные бактериальные плазмиды, такие как плазмиды из E.coli, в том числе pCR1, pBR322, pMB9 и их производные, и плазмиды для более широкого спектра хозяев, такие как M13 и другие нитевидные одноцепочечные ДНК-фаги.

Связывающие TIGIT агенты (например, полипептиды или антитела) согласно настоящему изобретению могут быть экспрессированы с одного или более векторов. Например, согласно некоторым вариантам реализации один полипептид тяжелой цепи экспрессирует один вектор, второй полипептид тяжелой цепи экспрессирует второй вектор, а полипептид легкой цепи экспрессирует третий вектор. Согласно некоторым вариантам реализации первый полипептид тяжелой цепи и полипептид легкой цепи экспрессирует один вектор, а второй полипептид тяжелой цепи экспрессирует второй вектор. Согласно некоторым вариантам реализации два полипептида тяжелой цепи экспрессирует один вектор, а полипептид легкой цепи экспрессирует второй вектор. Согласно некоторым вариантам реализации три полипептида экспрессируются с одного вектора. Соответственно, согласно некоторым вариантам реализации первый полипептид тяжелой цепи, второй полипептид тяжелой цепи и полипептид легкой цепи экспрессирует единственный вектор.

Подходящие для экспрессии связывающего TIGIT полипептида или антитела (или белка TIGIT для применения в качестве антигена) клетки-хозяева включают прокариотические, дрожжевые клетки, клетки насекомых или клетки высших эукариот под контролем подходящих промоторов. Прокариоты включают грамотрицательные или грамположительные организмы, например E.coli или Bacillus. Клетки высших эукариот включают стабильные линии клеток, происходящие из клеток млекопитающих согласно приведенному ниже описанию. Могут также применяться бесклеточные трансляционные системы. Подходящие клонирующие и экспрессионные векторы для применения в клетках-хозяевах бактерий, грибов, дрожжей и млекопитающих, а также способы получения белков, в том числе получения антител, хорошо известны в данной области техники.

Для экспрессии рекомбинантных полипептидов могут применяться различные системы на основе культур клеток млекопитающих. Экспрессия рекомбинантных белков в клетках млекопитающих может быть желательной, поскольку указанные белки обычно имеют надлежащую укладку, подходящим образом модифицированы и биологически функциональны. Примеры подходящих линий клеток-хозяев млекопитающих включают, не ограничиваясь перечисленными, линии клеток COS-7 (происходящие из почки обезьяны), L-929 (происходящие из фибробластов мыши), C127 (происходящие из опухоли молочной железы мыши), 3T3 (происходящие из фибробластов мыши), CHO (происходящие из яичника китайского хомячка), HeLa (происходящие из рака шейки матки человека), BHK (происходящие из фибробластов почки хомяка), HEK-293 (происходящие из эмбриональной почки человека) и их варианты. Экспрессионные векторы для млекопитающих могут содержать нетранскрибируемые элементы, такие как точка начала репликации, подходящий промотор и энхансер, соединенные с генов для предполагаемой экспрессии, и другие 5'- или 3'-фланкирующие нетранскрибируемые последовательности, а также 5'- или 3'-нетранслируемые последовательности, такие как необходимые сайты связывания рибосом, сайт поли-

аденилирования, донорные и акцепторные сайты сплайсинга, и последовательности терминации транскрипции.

Экспрессия рекомбинантных белков в системах на основе культур клеток насекомых (например, бакуловирусных) также представляет собой надежный способ получения биологически функциональных белков с надлежащей укладкой. Бакуловирусные системы для получения гетерологичных белков в клетках насекомых хорошо известны специалистам в данной области техники.

Соответственно, в настоящем изобретении предложены клетки, содержащие связывающие TIGIT агенты, описанные в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации указанные клетки продуцируют связывающие TIGIT агенты, описанные в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации указанные клетки продуцируют антитело. Согласно некоторым вариантам реализации указанные клетки продуцируют антитело, которое связывает TIGIT мыши. Согласно некоторым вариантам реализации указанные клетки продуцируют антитело, которое связывает TIGIT человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанные клетки продуцируют антитело, которое связывает TIGIT мыши и TIGIT человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанные клетки продуцируют антитело 313R11. Согласно некоторым вариантам реализации указанные клетки продуцируют антитело 313R12. Согласно некоторым вариантам реализации указанные клетки продуцируют антитело 313R14. Согласно некоторым вариантам реализации указанные клетки продуцируют антитело 313R19. Согласно некоторым вариантам реализации указанные клетки продуцируют антитело 313R20. Согласно некоторым вариантам реализации указанные клетки продуцируют антитело 313M26. Согласно некоторым вариантам реализации указанные клетки продуцируют антитело 313M32. Согласно некоторым вариантам реализации указанные клетки продуцируют антитело 313M33. Согласно некоторым вариантам реализации указанные клетки продуцируют биспецифическое антитело, которое связывает TIGIT. Согласно некоторым вариантам реализации указанные клетки продуцируют а биспецифическое антитело, которое связывает TIGIT и вторую мишень. Согласно некоторым вариантам реализации указанная клетка представляет собой гибридомную клетку. Согласно некоторым вариантам реализации указанная клетка представляет собой клетка млекопитающего. Согласно некоторым вариантам реализации указанная клетка представляет собой прокариотическую клетку. Согласно некоторым вариантам реализации указанная клетка представляет собой эукариотическую клетку.

Белки, продуцированные трансформированным хозяином, могут быть очищены в соответствии с любым подходящим способом. Стандартные способы включают хроматографию (например, ионообменную, аффинную и хроматографию на эксклюзионной колонке), центрифугирование, дифференциальную растворимость или любую другую стандартную технику очищения белков. Аффинные метки, такие как гекса-гистидин, мальтоза-связывающий домен, последовательность оболочки вируса гриппа и глутатион-S-трансфераза, могут быть присоединены к белку для обеспечения легкого очищения путем проведения через подходящую аффинную колонку. Аффинная хроматография, применяемая для очищения иммуноглобулинов, может включать хроматографию с белком A, белком G и белком L. Выделенные белки могут быть физически охарактеризованы с применением таких техник, как протеолиз, эксклюзионная хроматография (ЭХ), масс-спектрометрия (МС), ядерный магнитный резонанс (ЯМР), изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ), высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) и рентгеновская кристаллография. Чистота выделенных белков может быть определена с применением техник, известных специалистам в данной области техники, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, ДСН-ПААГ, ЭХ, капиллярный гель-электрофорез, ИЭФ и капиллярное изоэлектрическое фокусирование (кИЭФ).

Согласно некоторым вариантам реализации супернатанты из экспрессионных систем, которые секретируют рекомбинантный белок в культуральные среды, могут быть сначала сконцентрированы с применением коммерчески доступного фильтра для концентрации белка, например ультрафильтрационной установки Amicon или Millipore Pellicon. После этапа концентрации указанный концентрат может быть нанесен на подходящую матрицу для очищения. Согласно некоторым вариантам реализации может применяться анионообменная смола, например, матрица или субстрат с боковыми диэтиламиноэтильными (DEAE) группами. Матрицы могут быть акриламидными, агарозными, декстрановыми, целлюлозными или принадлежать к другим типам, обычно применяемым для очищения белков. Согласно некоторым вариантам реализации может проводиться этап катионного обмена. Подходящие катионообменники включают различные нерастворимые матрицы, содержащие сульфопропильные или карбоксиметильные группы. Согласно некоторым вариантам реализации могут применяться гидроксиапатитные среды, в том числе, но не ограничиваясь указанным, керамический гидроксиапатит (CHT). Согласно некоторым вариантам реализации для дополнительного очищения рекомбинантного белка (например, связывающего TIGIT агента) может применяться один или более этапов ВЭЖХ с обращенной фазой, задействующих гидрофобные среды для ОФ-ВЭЖХ, например силикагель с боковыми метальными или другими алифатическими группами. Некоторые или все из перечисленных выше этапов очищения, в различных комбинациях, могут применяться для получения гомогенного рекомбинантного белка.

Согласно некоторым вариантам реализации гетеродимерные белки, такие как биспецифические антитела, очищают в соответствии с любыми способами, описанными в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации биспецифические антитела против TIGIT выделяют и/или очищают с

применением по меньшей мере одного хроматографического этапа. Согласно некоторым вариантам реализации указанный по меньшей мере один хроматографический этап включает аффинную хроматографию. Согласно некоторым вариантам реализации указанный по меньшей мере один хроматографический этап дополнительно включает анионообменную хроматографию. Согласно некоторым вариантам реализации продукт - выделенное и/или очищенное антитело содержит по меньшей мере на 90% гетеродимерное антитело. Согласно некоторым вариантам реализации продукт - выделенное и/или очищенное антитело содержит по меньшей мере на 95, 96, 97, 98 или 99% гетеродимерное антитело. Согласно некоторым вариантам реализации продукт - выделенное и/или очищенное антитело содержит приблизительно 100% гетеродимерное антитело.

Согласно некоторым вариантам реализации полипептид, продуцированный в бактериальной культуре, может быть выделен, например, путем начальной экстракции из клеточного осадка с последующим одним или более этапов концентрации, высаливания, водного ионного обмена или эксклюзионной хроматографии. Для этапов конечного очищения может применяться ВЭЖХ. Клетки микроорганизмов, применяемые для экспрессии рекомбинантного белка, могут быть разрушены с применением любого удобного способа, в том числе циклического замораживания-размораживания, обработки ультразвуком, механического разрушения или применения лизирующих клетки агентов.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой полипептид, который не является антителом или не содержит Fc-области иммуноглобулина. Различные способы идентификации и продуцирования не являющихся антителами полипептидов, которые связывают белковые мишени с высоким сродством, известны в данной области техники. Согласно некоторым вариантам реализации может применяться технология фагового дисплея или дисплея у млекопитающих для получения и/или идентификации связывающего TIGIT полипептида. Согласно некоторым вариантам реализации указанный полипептид содержит белковый скаффолд, принадлежащий к типу, выбранному из группы, состоящей из белка A, белка G, липокалина, фибронектинового домена, консенсусного домена с анкириновыми повторами и тиоредоксина. Различные способы идентификации и получения не являющихся антителами полипептидов, которые связывают белковую мишень с высоким сродством, известны в данной области техники. Согласно некоторым вариантам реализации для получения и/или идентификации связывающего полипептида может применяться технология фагового дисплея. Согласно некоторым вариантам реализации для получения и/или идентификации может применяться технология дисплея связывающего полипептида в клетках млекопитающих.

Может быть желательно дополнительно модифицировать полипептид для увеличения (или уменьшения) времени полужизни в сыворотке. Это может быть достигнуто, например, путем включения эпитопа связывания рецептора реутилизации в полипептид посредством мутации подходящей области в полипептиде или путем включения указанного эпитопа в пептидную метку, которую затем сливают с любым концом полипептида или с областью в середине полипептида (например, путем синтеза ДНК или пептидного синтеза).

Гетероконъюгатные молекулы также входят в объем настоящего изобретения. Гетероконъюгатные молекулы состоят из двух ковалентно соединенных полипептидов. Такие молекулы были предложены, например, для нацеливания иммунных клеток на нежелательные клетки, такие как опухолевые клетки. Также предусмотрена возможность получения гетероконъюгатных молекул in vitro с применением известных способов химии синтеза белков, в том числе задействующих агенты для перекрестного связывания. Например, иммунотоксины могут быть сконструированы с применением реакции дисульфидного обмена или посредством образования тиоэфирной связи. Примеры подходящих для указанной цели реагентов включают иминотиолат и метил-4-меркаптобутиримидат.

Согласно некоторым вариантам реализации связывающие TIGIT агенты могут применяться в любой из ряда конъюгированных форм (т.е. в виде иммуноконъюгата или радиоконъюгата) или в неконъюгированной форме. Согласно некоторым вариантам реализации указанные агенты могут применяться в неконъюгированной форме для вовлечения естественных механизмов защиты субъекта, в том числе комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ) и антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) для элиминации злокачественных или раковых клеток.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент конъюгирован с цитотоксическим агентом. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент представляет собой антитело, конъюгированное с цитотоксическим агентом в виде ADC (конъюгат антитела с лекарственным средством). Согласно некоторым вариантам реализации указанный цитотоксический агент представляет собой химиотерапевтический агент, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, метотрексат, адриамицин/доксорубицин, мелфалан, митомицин C, хлорамбуцил, даунорубицин, пирролобензодиазепины (PBD) или другие интеркалирующие агенты. Согласно некоторым вариантам реализации указанный цитотоксический агент представляет собой ферментативно активный токсин бактериального, грибного, растительного или животного происхождения, или его фрагменты, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, цепь A дифтерийного токсина, несвязывающие активные фрагменты дифтерийного токсина, цепь A экзотоксина, цепь A рицина, цепь A абрина, цепь A модессина, α-сарцин, белки Aleurites fordii, диантиновые белки, белки Phytolaca americana (PAPI, PAPII и PAP-S),

ингибитор Momordica charantia, курцин, кротин, ингибитор Saponaria officinalis, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трихотецины. Согласно некоторым вариантам реализации указанный цитотоксический агент представляет собой радиоизотоп для получения радиоконъюгата или радиоконъюгированного антитела. Доступны различные радионуклиды для получения радиоконъюгированных антител, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, ^{90}Y, ^{125}I, ^{131}I, ^{123}I, ^{111}In, ^{131}In, ^{105}Rh, ^{153}Sm, ^{67}Cu, ^{67}Ga, ^{166}Ho, ^{177}Lu, ^{186}Re, ^{188}Re и ^{212}Bi. Могут также применяться конъюгаты антитела с одним или более низкомолекулярными токсинами, например калихеамицинами, мейтансиноидами, трихотенами и CC1065, и производными указанных токсинов, обладающими активностью токсинов. Конъюгаты антитела и цитотоксического агента могут быть получены с применением различных бифункциональных связывающих белки агентов, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитиол)пропионат (SPDP), иминотиолан (IT), бифункциональные производные имидоэфиров (такие как диметиладипимидат HCl), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидосоединения (такие как бис(п-азидобензоил) гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис-(п-диазонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат) и бис-активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензен).

III. Полинуклеотиды.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретением охвачены полинуклеотиды, содержащие полинуклеотиды, которые кодируют агент, описанный в настоящем документе. Термином "полинуклеотиды, которые кодируют полипептид" охвачен полинуклеотид, который включает только кодирующие последовательности указанного полипептида, а также полинуклеотид, который включает дополнительные кодирующие и/или некодирующие последовательности. Полинуклеотиды согласно настоящему изобретению могут быть представлены в форме РНК или в форме ДНК. ДНК включает кДНК, геномную ДНК и синтетическую ДНК; они могут быть двуцепочечными или одноцепочечными; одноцепочечная ДНК может представлять собой кодирующую цепь или некодирующую (антисмысловую) цепь.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный полинуклеотид содержит полинуклеотид (например, последовательность нуклеотидов), кодирующий полипептид, содержащий последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 55 и SEQ ID NO: 56.

Согласно некоторым вариантам реализации полинуклеотид содержит полинуклеотид, последовательность нуклеотидов которого по меньшей мере приблизительно на 80% идентична, по меньшей мере приблизительно на 85% идентична, по меньшей мере приблизительно на 90% идентична, по меньшей мере приблизительно на 95% идентична и, согласно некоторым вариантам реализации, по меньшей мере приблизительно на 96, 97, 98 или 99% идентична полинуклеотиду, кодирующему последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 55 и SEQ ID NO: 56. Также предложен полинуклеотид, который содержит полинуклеотид, который гибридизуется с полинуклеотидом, кодирующим последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 55 и SEQ ID NO: 56. Согласно некоторым вариантам реализации указанная гибридизация проходит в условиях высокой жесткости. Условия высокой жесткости известны специалистам в данной области техники и могут включать, не ограничиваясь перечисленными, (1) использование низкой ионной силы и высокой температуры для промывания, например 15 мМ хлорида натрия/1,5 мМ цитрата натрия (1× SSC) с 0,1% додецилсульфатом натрия при 50°C; (2) использование при гибридизации денатурирующего агента, такого как формамид, например, 50% (по объему) формамида с 0,1% бычьего сывороточного альбумина/0,1% фиколла/0,1% поливинилпирролидона/50 мМ натрий-фосфатного буфера при pH 6,5 в 5× SSC (0,75 M NaCl, 75 мМ цитрат натрия) при 42°C; или (3) использование 50% формамида, 5× SSC, 50 мМ фосфата натрия (pH 6,8), 0,1% пирофосфата натрия, 5× раствора Денхардта, обработанной ультразвуком ДНК спермы лосося (50 мкг/мл), 0,1% ДСН и 10% сульфата декстрана при 42°C, с промыванием 0,2× SSC, содержащим 50% формамида, при 55°C, с последующим промыванием в условиях высокой жесткости, включающих 0,1× SSC, содержащей ЭДТК, при 55°C.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный полинуклеотид содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 82 и SEQ ID NO: 83.

Согласно некоторым вариантам реализации полинуклеотид содержит полинуклеотид, последовательность нуклеотидов которого по меньшей мере приблизительно на 80% идентична, по меньшей мере

приблизительно на 85% идентична, по меньшей мере приблизительно на 90% идентична, по меньшей мере приблизительно на 95% идентична и, согласно некоторым вариантам реализации, по меньшей мере приблизительно на 96, 97, 98 или 99% идентична полинуклеотиду, кодирующему последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 82 и SEQ ID NO: 83. Также предложен полинуклеотид, который содержит полинуклеотид, который гибридизуется с полинуклеотидом, кодирующим последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 82 и SEQ ID NO: 83.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный полинуклеотид содержит последовательность полинуклеотидов, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76 и SEQ ID NO: 84. Согласно некоторым вариантам реализации полинуклеотид содержит полинуклеотид, последовательность нуклеотидов которого по меньшей мере приблизительно на 80% идентична, по меньшей мере приблизительно 85% идентична, по меньшей мере приблизительно 90% идентична, по меньшей мере приблизительно 95% идентична и, согласно некоторым вариантам реализации, по меньшей мере приблизительно на 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности нуклеотидов, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76 и SEQ ID NO: 84. Также предложен полинуклеотид, который содержит полинуклеотид, который гибридизуется с последовательностью полинуклеотидов, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76 и SEQ ID NO: 84. Согласно некоторым вариантам реализации указанные техники гибридизации реализуют в условиях высокой жесткости согласно описанию выше.

Согласно некоторым вариантам реализации полинуклеотид содержит кодирующую последовательность зрелого полипептида, слитую внутри одной рамки считывания с полинуклеотидом, который помогает, например, экспрессии и секреции полипептида из клетки-хозяина (например, лидерной последовательности, которая функционирует в качестве секреторной последовательности для управления транспортом полипептида из клетки). Указанный полипептид, содержащий лидерную последовательность, представляет собой белок-предшественник и может содержать лидерную последовательность, расщепляемую клеткой-хозяином с образованием зрелой формы полипептида. Указанные полинуклеотиды могут также кодировать белок-предшественник, представляющий собой зрелый белок, содержащий дополнительные 5'-концевые остатки аминокислот. Зрелый белок, содержащий пропоследовательность, представляет собой белок-предшественник и является неактивной формой белка. После расщепления пропоследовательности остается активный зрелый белок.

Согласно некоторым вариантам реализации полинуклеотид содержит кодирующую последовательность зрелого полипептида, слитого внутри той же рамки считывания с последовательностью маркера, которая обеспечивает, например, очищение кодируемого полипептида. Например, последовательность маркера может представлять собой гекса-гистидиновую метку, доставляемую вектором pQE-9, для обеспечения очищения зрелого полипептида, слитого с указанным маркером, в случае использования хозяина-бактерии, или последовательность маркера может представлять собой гемагглютининовую (ГА) метку, происходящую из белка гемагглютинина вируса гриппа, в случае использования хозяина-млекопитающего (например, клеток COS-7). Согласно некоторым вариантам реализации последовательность маркера представляет собой FLAG-метку, пептид с последовательностью DYKDDDDK (SEQ ID NO: 40), которая может применяться в сочетании с другими аффинными метками.

Настоящее изобретение также относится к вариантам полинуклеотидов, описанных в настоящем документе, отличающихся тем, что указанный вариант кодирует, например, фрагменты, аналоги и/или производные.

Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложен полинуклеотид, содержащий полинуклеотид, последовательность нуклеотидов которого по меньшей мере приблизительно на 80% идентична, по меньшей мере приблизительно на 85% идентична, по меньшей мере приблизительно на 90% идентична, по меньшей мере приблизительно на 95% идентична и, согласно некоторым вариантам реализации, по меньшей мере приблизительно на 96, 97, 98 или 99% идентична полинуклеотиду, кодирующему полипептид, содержащий связывающий TIGIT агент, описанный в документе.

В настоящем документе при упоминании полинуклеотида, последовательность нуклеотидов которого по меньшей мере, например, на 95% "идентична" референсной последовательности нуклеотидов, предполагается, что последовательность нуклеотидов указанного полинуклеотида идентична указанной референсной последовательности, за исключением того, что указанная последовательность полинуклеотидов может включать до пяти точечных мутаций на каждые 100 нуклеотидов референсной последовательности нуклеотидов. Иными словами, для получения полинуклеотида, последовательность нуклеотидов которого по меньшей мере на 95% идентична референсной последовательности нуклеотидов, до 5% нуклеотидов референсной последовательности может быть удалено или заменено на другой нуклеотид, или ряд нуклеотидов, до 5% от общего числа нуклеотидов в референсной последовательности, может

быть встроен в указанную референсную последовательность. Указанные мутации референсной последовательности могут возникать в 5'- или 3'-концевых положениях референсной последовательности нуклеотидов или где-либо между указанными концевыми положениями, либо по отдельности распределенные между нуклеотидами референсной последовательности, либо в виде одной или более непрерывных групп в составе референсной последовательности.

Варианты полинуклеотидов могут содержать изменения кодирующих областей, некодирующих областей, или и первых, и вторых. Согласно некоторым вариантам реализации вариант полинуклеотида содержит изменения, которые обуславливают возникновение молчащих замен, добавлений или делеций, однако не изменяет свойства или виды активности кодируемого полипептида. Согласно некоторым вариантам реализации вариант полинуклеотида содержит молчащие замены, которые не приводят к изменению последовательности аминокислот полипептида (ввиду вырожденности генетического кода). Варианты полинуклеотидов могут быть получены для различных целей, например для оптимизации экспрессии кодонов у конкретного хозяина (т.е. изменение кодонов в мРНК человека на кодоны, предпочтительные для хозяина-бактерии, такой как E.coli). Согласно некоторым вариантам реализации вариант полинуклеотида содержит по меньшей мере одну молчащую мутацию в некодирующей или кодирующей области последовательности.

Согласно некоторым вариантам реализации получают вариант полинуклеотида для модуляции или изменения экспрессии (или уровней экспрессии) кодируемого полипептида. Согласно некоторым вариантам реализации получают вариант полинуклеотида для повышения экспрессии кодируемого полипептида. Согласно некоторым вариантам реализации получают вариант полинуклеотида для снижения экспрессии кодируемого полипептида. Согласно некоторым вариантам реализации вариант полинуклеотида обеспечивает повышенную экспрессию кодируемого полипептида по сравнению с исходной последовательностью полинуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации вариант полинуклеотида обеспечивает сниженную экспрессию кодируемого полипептида по сравнению с исходной последовательностью полинуклеотидов.

Согласно некоторым вариантам реализации получают по меньшей мере один вариант полинуклеотида (без изменения последовательности аминокислот кодируемого полипептида) для увеличения продуцирования гетеродимерной молекулы. Согласно некоторым вариантам реализации получают по меньшей мере один вариант полинуклеотида (без изменения последовательности аминокислот кодируемого полипептида) для увеличения продуцирования биспецифического антитела.

Согласно некоторым вариантам реализации указанные полинуклеотиды являются выделенными. Согласно некоторым вариантам реализации указанные полинуклеотиды являются по существу чистыми.

Также предложены векторы и клетки, содержащие полинуклеотиды, описанные в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации экспрессионный вектор содержит молекулу полинуклеотида. Согласно некоторым вариантам реализации клетка-хозяин содержит экспрессионный вектор, содержащий указанную молекулу полинуклеотида. Согласно некоторым вариантам реализации клетка-хозяин содержит молекулу полинуклеотида.

IV. Способы применения и фармацевтические композиции.

Связывающие TIGIT агенты согласно настоящему изобретению подходят для различных вариантов применения, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, для способов терапевтического лечения, например, для лечения рака. Согласно некоторым вариантам реализации указанные способы терапевтического лечения включают иммунотерапию рака. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент подходит для активации иммунного ответа, стимуляции иммунного ответа, увеличения и/или усиления иммунного ответа, ингибирования роста опухоли, уменьшения объема опухоли, увеличения апоптоза опухолевых клеток и/или уменьшения туморогенности опухоли. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент согласно настоящему изобретению также подходит для иммунотерапии, направленной против патогенов, таких как вирусы. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент подходит для активации иммунного ответа, стимуляции иммунного ответа, повышения и/или усиления иммунного ответа, ингибирования вирусной инфекции, уменьшения вирусной инфекции, увеличения апоптоза инфицированных вирусом клеток и/или повышения киллинга инфицированных вирусами клеток. Указанные способы применения могут представлять собой осуществляемые in vitro, ex vivo или in vivo способы.

В настоящем изобретении предложены способы активации иммунного ответа у субъекта с применением связывающего TIGIT агента, описанного в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложены способы стимуляции иммунного ответа у субъекта с применением связывающего TIGIT агента, описанного в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложены способы повышения иммунного ответа у субъекта с применением связывающего TIGIT агента, описанного в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложены способы усиления иммунного ответа у субъекта с применением связывающего TIGIT агента, описанного в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации указанная активация иммунного ответа, стимуляция иммунного ответа, повышение и/или усиление иммунного ответа включает повышение клеточного иммунитета. Со-

гласно некоторым вариантам реализации указанная активация иммунного ответа, стимуляция иммунного ответа, повышение и/или усиление иммунного ответа включает повышение Т-клеточной активности. Согласно некоторым вариантам реализации указанная активация иммунного ответа, стимуляция иммунного ответа, повышение и/или усиление иммунного ответа включает повышение CTL-активности. Согласно некоторым вариантам реализации указанная активация иммунного ответа, стимуляция иммунного ответа, повышение и/или усиление иммунного ответа включает повышение активности NK-клеток. Согласно некоторым вариантам реализации указанная активация иммунного ответа, стимуляция иммунного ответа, повышение и/или усиление иммунного ответа включает повышение Т-клеточной активности и повышение активности NK-клеток. Согласно некоторым вариантам реализации указанная активация иммунного ответа, стимуляция иммунного ответа, повышение и/или усиление иммунного ответа включает повышение CTL-активности и повышение активности NK-клеток. Согласно некоторым вариантам реализации указанная активация иммунного ответа, стимуляция иммунного ответа, повышение и/или усиление иммунного ответа включает ингибирование или снижение супрессорной активности клеток Treg. Согласно некоторым вариантам реализации указанная активация иммунного ответа, стимуляция иммунного ответа, повышение и/или усиление иммунного ответа включает ингибирование или снижение супрессорной активности клеток СКМП. Согласно некоторым вариантам реализации указанный иммунный ответ представляет собой результат антигенной стимуляции. Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенная стимуляция представляет собой опухолевую клетку. Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенная стимуляция представляет собой рак. Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенная стимуляция представляет собой патоген. Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенная стимуляция представляет собой вирус. Согласно некоторым вариантам реализации указанная антигенная стимуляция представляет собой инфицированную вирусом клетку. Согласно некоторым вариантам реализации любых из способов, описанных в настоящем документе, связывающий TIGIT агент представляет собой антитело против TIGIT. Согласно некоторым вариантам реализации любых из способов, описанных в настоящем документе, связывающий TIGIT агент представляет собой антитело 313M32.

Согласно некоторым вариантам реализации способ повышения иммунного ответа у субъекта включает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества связывающего TIGIT агента, описанного в настоящем документе, при этом указанный агент представляет собой антитело, специфически связывающее внеклеточный домен TIGIT. Согласно некоторым вариантам реализации способ повышения иммунного ответа у субъекта включает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества связывающего TIGIT агента, описанного в настоящем документе, при этом указанный агент представляет собой антитело, специфически связывающее внеклеточный домен TIGIT человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ повышения иммунного ответа у субъекта включает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества антитела 313M32.

Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложено применение связывающего TIGIT агента, описанного в настоящем документе, при получении или составлении медикамента для активации иммунного ответа, стимуляции иммунного ответа, повышения и/или усиления иммунного ответа. Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложено применение связывающего TIGIT агента, описанного в настоящем документе, при получении или составлении медикамента для повышения клеточного иммунитета. Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложено применение связывающего TIGIT агента, описанного в настоящем документе, при получении или составлении медикамента для повышения Т-клеточной активности. Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложено применение связывающего TIGIT агента, описанного в настоящем документе, при получении или составлении медикамента для повышения CTL-активности. Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложено применение связывающего TIGIT агента, описанного в настоящем документе, при получении или составлении медикамента для повышения NK-активности. Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложено применение связывающего TIGIT агента, описанного в настоящем документе, при получении или составлении медикамента для ингибирования или снижения супрессорной активности клеток Treg. Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложено применение связывающего TIGIT агента, описанного в настоящем документе, при получении или составлении медикамента для ингибирования или снижения супрессорной активности клеток СКМП.

В настоящем изобретении также предложены способы ингибирования и/или снижения сигнализации TIGIT в клетке, включающие приведение указанной клетки в контакт с эффективным количеством связывающего TIGIT агента, описанного в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ ингибирования и/или снижения сигнализации TIGIT в клетке включает приведение указанной клетки в контакт с эффективным количеством антитела 313M32. Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложено применение связывающего TIGIT агента, описанного в настоящем документе, при получении или составлении медикамента для ингибирования

и/или снижения сигнализации TIGIT в клетке. Согласно некоторым вариантам реализации указанная клетка представляет собой Т-клетку. Согласно некоторым вариантам реализации указанная клетка представляет собой активированную Т-клетку. Согласно некоторым вариантам реализации указанная клетка представляет собой NK-клетку. Согласно некоторым вариантам реализации указанная клетка представляет собой Treg. Согласно некоторым вариантам реализации указанная клетка представляет собой СКМП. Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ представляет собой in vivo способ, характеризующийся тем, что указанный этап приведения указанной клетки в контакт с указанным агентом включает введение терапевтически эффективного количества связывающего TIGIT агента указанному субъекту. Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ представляет собой in vitro или ex vivo способ.

В настоящем изобретении также предложены способы ингибирования роста опухоли с применением связывающего TIGIT агента, описанного в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ ингибирования роста опухоли включает применение антитела 313M32. Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ ингибирования роста опухоли включает приведение смеси клеток в контакт со связывающим TIGIT агентом in vitro. Например, клетки иммортализованной линии или клетки раковой линии, смешанные с иммунными клетками (например, Т-клетками или NK-клетками), культивируют в среде, в которую добавляют тестируемый агент, который связывает TIGIT. Согласно некоторым вариантам реализации опухолевые клетки выделяют из образца от пациента, такого как, например, биоптат ткани, плевральный выпот или образец крови, смешанного с иммунными клетками (например, Т-клетками и/или NK-клетками), и культивируют в среде, в которую добавляют тестируемый агент, который связывает TIGIT. Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложено применение связывающего TIGIT агента, описанного в настоящем документе, при получении или составлении медикамента для ингибирования роста опухоли или опухолевой клетки. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент повышает активность, стимулирует активность и/или усиливает активность иммунных клеток. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент ингибирует рост опухолевых клеток.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ ингибирования роста опухоли включает приведение в контакт указанной опухоли или опухолевых клеток со связывающим TIGIT агентом, описанным в настоящем документе in vivo. Согласно некоторым вариантам реализации приведение в контакт опухоли или опухолевой клетки со связывающим TIGIT агентом осуществляют в модели на животных. Например, тестируемый агент может вводиться мышам, имеющим опухоли. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент повышает активность, стимулирует активность и/или усиливает активность иммунных клеток у мышей. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент ингибирует рост опухоли. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент обеспечивает регресс опухоли. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент вводят животному одновременно с введением опухолевых клеток или через непродолжительное время после введения опухолевых клеток для предотвращения роста опухоли ("модель предотвращения"). Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент вводят в качестве терапевтического средства после того, как опухоли достигают определенного размера или становятся "развившимися" ("терапевтическая модель").

Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ ингибирования роста опухоли включает введение субъекту терапевтически эффективного количества связывающего TIGIT агента, описанного в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации указанный субъект представляет собой человека. Согласно некоторым вариантам реализации у указанного субъекта имеется опухоль или у указанного субъекта имелась опухоль, которая была по меньшей мере частично удалена. Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ ингибирования роста опухоли включает введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела 313M32.

Кроме того, в настоящем изобретении предложен способ ингибирования роста опухоли у субъекта, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества связывающего TIGIT агента, описанного в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложено применение связывающего TIGIT агента, описанного в настоящем документе, при получении или составлении медикамента для ингибирования роста опухоли или опухолевой клетки. Согласно некоторым вариантам реализации указанная опухоль содержит раковые стволовые клетки. Согласно некоторым вариантам реализации частота встречаемости раковых стволовых клеток в опухоли снижается за счет введения указанного агента. Согласно некоторым вариантам реализации предложен способ уменьшения частота встречаемости раковых стволовых клеток в опухоли у субъекта, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества связывающего TIGIT агента.

Кроме того, в настоящем изобретении предложен способ уменьшения туморогенности опухоли у субъекта, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества связывающего TIGIT агента, описанного в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации указанная опухоль содержит раковые стволовые клетки. Согласно некоторым вариантам реализации ту-

морогенность опухоли снижается за счет уменьшения частоты встречаемости раковых стволовых клеток в опухоли. Согласно некоторым вариантам реализации указанные способы включают применение связывающих TIGIT агентов, описанных в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации частота встречаемости раковых стволовых клеток в опухоли снижается за счет введения связывающего TIGIT агента, описанного в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации способ уменьшения туморогенности опухоли у субъекта включает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества антитела 313M32.

Согласно некоторым вариантам реализации указанная опухоль представляет собой солидную опухоль. Согласно некоторым вариантам реализации указанная опухоль представляет собой опухоль, выбранную из группы, состоящей из: опухоли ободочной и прямой кишки, опухоли поджелудочной железы, опухоли легкого, опухоли яичника, опухоли печени, опухоли молочной железы, опухоли почки, опухоли предстательной железы, нейроэндокринной опухоли, опухоли желудочно-кишечного тракта, меланомы, опухоли шейки матки, опухоли мочевого пузыря, глиобластомы и опухоли головы и шеи. Согласно некоторым вариантам реализации указанная опухоль представляет собой опухоль ободочной и прямой кишки. Согласно некоторым вариантам реализации указанная опухоль представляет собой опухоль яичника. Согласно некоторым вариантам реализации указанная опухоль представляет собой опухоль легкого. Согласно некоторым вариантам реализации указанная опухоль представляет собой опухоль поджелудочной железы. Согласно некоторым вариантам реализации указанная опухоль представляет собой опухоль в виде меланомы.

В настоящем изобретении предложены способы лечения рака, включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества связывающего TIGIT агента, описанного в настоящем документе, (например, нуждающемуся в лечении субъекту). Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложено применение связывающего TIGIT агента, описанного в настоящем документе, в изготовлении или получении медикамента для лечения рака. Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент связывает TIGIT человека и ингибирует или снижает рост рака. Согласно некоторым вариантам реализации указанный субъект представляет собой человека. Согласно некоторым вариантам реализации у указанного субъекта имеется раковая опухоль. Согласно некоторым вариантам реализации опухоль у указанного субъекта была по меньшей мере частично удалена. Согласно некоторым вариантам реализации способ лечения рака у субъекта включает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества антитела 313M32.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак представляет собой рак, выбранный из группы, состоящей из рака ободочной и прямой кишки, рака поджелудочной железы, рака легкого, рака яичников, рака печени, рака молочной железы, рака почки, рака предстательной железы, рака желудочно-кишечного тракта, меланомы, рака шейки матки, нейроэндокринного рака, рака мочевого пузыря, глиобластомы и рака головы и шеи. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак представляет собой рак поджелудочной железы. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак представляет собой рак яичников. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак представляет собой рак ободочной и прямой кишки. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак представляет собой рак молочной железы. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак представляет собой рак предстательной железы. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак представляет собой рак легкого. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак представляет собой меланому.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак представляет собой рак крови. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак крови представляет собой лейкоз. Согласно другим вариантам реализации указанный рак крови представляет собой лимфому. Согласно определенному варианту реализации указанный рак выбран из группы, состоящей из: острого миелогенного лейкоза (ОМЛ), лимфомы Ходжкина, множественной миеломы, Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза (Т-ОЛЛ), хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), лейкоза ворсистых клеток, хронического миелогенного лейкоза (ХМЛ), неходжкинской лимфомы, диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL), мантийноклеточной лимфомы (МКЛ) и кожной Т-клеточной лимфомы (CTCL).

Согласно некоторым вариантам реализации способов, описанных в настоящем документе, способ дополнительно включает этап определения уровня экспрессии PD-L1 в указанной опухоли или указанном раке. Согласно некоторым вариантам реализации определение уровня экспрессии PD-L1 выполняют до лечения, со связывающим TIGIT агентом, описанным в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации в том случае, если опухоль или рак отличается повышенным уровнем экспрессии PD-L1, указанному субъекту вводят связывающий TIGIT агент. Согласно некоторым вариантам реализации способ включает:(i) получение образца рака или опухоли от субъекта; (ii) измерение уровня экспрессии PD-L1 в указанном образце; и (iii) введение эффективного количества связывающего TIGIT агента указанному субъекту в том случае, если указанная опухоль или указанный рак отличается повышенным уровнем экспрессии PD-L1. Согласно некоторым вариантам реализации указанный образец представляет собой образец биопсии. Согласно некоторым вариантам реализации указанный образец содержит опухолевые клетки, инфильтрирующие опухоль иммунные клетки, стромальные клетки и любую их комбина-

цию. Согласно некоторым вариантам реализации указанный образец представляет собой зафиксированный в формалине залитый парафином (FFPE) образец. Согласно некоторым вариантам реализации указанный образец является архивным, свежим или замороженным образцом ткани. Согласно некоторым вариантам реализации уровень экспрессии PD-L1 в указанном образце сравнивают с заранее определенным уровнем экспрессии PD-L1. Согласно некоторым вариантам реализации указанный заранее определенным уровень экспрессии экспрессии PD-L1 представляет собой уровень экспрессии PD-L1 в референсном опухолевом образце, референсном образце нормальной ткани, ряде референсных опухолевых образцов или ряде референсных образцов нормальной ткани. Согласно некоторым вариантам реализации уровень экспрессии PD-L1 определяют с применением иммуногистохимического (IHC) анализа. Согласно некоторым вариантам реализации уровень экспрессии PD-L1 определяют с применением анализа, который включает оценку H-индекса. Согласно некоторым вариантам реализации уровень экспрессии PD-L1 определяют с применением антитела, специфически связывающего PD-L1. Согласно некоторым вариантам реализации PD-L1 детектируют на опухолевых клетках. Согласно некоторым вариантам реализации PD-L1 детектируют на инфильтрирующих опухоль иммунных клеток.

При комбинированной терапии двумя или более терапевтическими агентами часто применяют агенты, работающие за счет разных механизмов действия, хотя это не является необходимым. Комбинированная терапия с применением агентов с разными механизмами действия может обеспечивать аддитивные или синергические эффекты. Комбинированная терапия может позволить применение более низкой дозы каждого агента, чем при монотерапии, таким образом уменьшая токсические побочные эффекты и/или увеличивая терапевтический индекс указанного агента (агентов). Комбинированная терапия может снижать вероятность появления резистентных раковых клеток. Согласно некоторым вариантам реализации комбинированная терапия включает терапевтический агент, который влияет на иммунный ответ (например, усиливает или активирует указанный ответ), и терапевтический агент, который влияет на опухолевые/раковые клетки (например, ингибирует или убивает их).

Согласно некоторым вариантам реализации комбинация агента, описанного в настоящем документе, и по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента обеспечивает аддитивные или синергические результаты. Согласно некоторым вариантам реализации комбинированная терапия приводит к увеличению терапевтического индекса указанного агента. Согласно некоторым вариантам реализации комбинированная терапия приводит к увеличению терапевтического индекса дополнительного(ых) терапевтического(их) агента(ов). Согласно некоторым вариантам реализации комбинированная терапия приводит к уменьшению токсичности и/или побочных эффектов указанного агента. Согласно некоторым вариантам реализации комбинированная терапия приводит к уменьшению токсичности и/или побочных эффектов дополнительного(ых) терапевтического(их) агента(ов).

Согласно некоторым вариантам реализации помимо введения связывающего TIGIT агента, описанного в настоящем документе, способ или лечение дополнительно включает введение по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента. Дополнительный терапевтический агент может вводиться до введения, одновременно с введением или после введения указанного агента. Согласно некоторым вариантам реализации указанный по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент включает 1, 2, 3 или более дополнительных терапевтических агентов.

Терапевтические агенты, которые могут вводиться в комбинации с агентами, описанными в настоящем документе, включают химиотерапевтические агенты. Соответственно, согласно некоторым вариантам реализации указанный способ или лечение включает введение агента согласно настоящему изобретению в комбинации с химиотерапевтическим агентом или в комбинации с коктейлем химиотерапевтических агентов. Лечение агентом может происходить до введения, одновременно с введением или после введения химиотерапевтических средств. Комбинированное введение может включать совместное введение, либо в одном фармацевтическом составе, либо с применением отдельных составов, или последовательное введение в любом порядке, однако, как правило, в пределах некоторого периода времени, таким образом, чтобы все активные агенты могли осуществлять свою биологическую активность одновременно. Получение и схемы дозирования таких химиотерапевтических агентов могут быть реализованы в соответствии с инструкциями производителя или могут быть определены практикующим специалистом эмпирическим путем. Получение и схемы дозирования для такой химиотерапии также описаны в источнике: The Chemotherapy Source Book, 4th Edition, 2008, M.C. Perry, Editor, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.

Подходящие классы терапевтических агентов включают, например, антитубулиновые агенты, ауристатины, связывающиеся с малой бороздкой ДНК вещества, ингибиторы репликации ДНК, алкилирующие агенты (например, комплексы платины, такие как цисплатин, моно(платина), бис(платина) и трехъядерные комплексы платины, и карбоплатин), антрациклины, антибиотики, антифолаты, антиметаболиты, химиосенсибилизаторы, дуокармицины, этопозиды, фторированные пиримидины, ионофоры, лекситропсины, нитрозомочевины, платинолы, пуриновые антиметаболиты, пуромицины, радиосенсибилизаторы, стероиды, таксаны, ингибиторы топоизомеразы, алкалоиды барвинка, или т.п. Согласно некоторым вариантам реализации указанный второй терапевтический агент представляет собой алкилирующий агент, антиметаболит, антимитотик, ингибитор топоизомеразы или ингибитор ангиогенеза.

Химиотерапевтические агенты, подходящие для применения согласно настоящему изобретению, включают, не ограничиваясь перечисленными, алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид (ЦИТОКСАН); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, в том числе алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентиофосфорамид и триметилолмеламин; мустаргены, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, мехлорэтаминоксида гидрохлорид, мелфалан, новэмбихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урамустин; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, ранимустин; антибиотики, такие как аклациномицины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, сактиномицин, калихеамицин, карабицин, карминомицин, карзинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин, эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марселломицин, митомицины, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиромицин, пуромицин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитозинарабинозид, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин, 5-FU; андрогены, такие как калустерон, дромостанолона пропионат, эпитиостанол, мепитиостан, тестолактон; угнетающие функции надпочечников средства, такие как аминоглутетимид, митотан, трилостан; восполнители фолиевой кислоты, такие как фолиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамида гликозид; аминолевулиновую кислоту; амсакрин; бестрабуцил; бизантрен; эдатрексат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; элфорнитин; эллиптиния ацетат; этоглюцид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лонидамин; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитракрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; подофиллиновую кислоту; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK; разоксан; сизофуран; спирогерманий; тенуазоновую кислоту; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид (Ara-C); таксоиды, например, паклитаксел (ТАКСОЛ) и доцетаксел (ТАКСОТЕР); хлорамбуцил; гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; платина; этопозид (VP-16); ифосфамид; митомицин C; митоксантрон; винкристин; винорелбин; навельбин; новантрон; тенипозид; дауномицин; аминоптерин; ибандронат; CPT11; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифторметилорнитин (DMFO); ретиноевую кислоту; эсперамицины; капецитабин (КСЕЛОДА); и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любых из вышеперечисленных агентов. Химиотерапевтические агенты также включают антигормональные агенты, действующие как регуляторы или ингибиторы действия гормонов на опухоли, например антиэстрогены, включая, например, тамоксифен, ралоксифен, ингибирующие ароматазы 4(5)-имидазолы, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и торемифен (FARESTON); и антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гозерелин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любых из вышеперечисленных агентов. Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой цисплатин. Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой карбоплатин.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный химиотерапевтический агент представляет собой ингибитор топоизомеразы. Ингибиторы топоизомеразы представляют собой химиотерапевтические агенты, вмешивающиеся в действие фермента топоизомеразы (например, топоизомеразы I или II). Ингибиторы топоизомеразы включают, не ограничиваясь перечисленными, доксорубицин HCl, цитрат даунорубицина, митоксантрон HCl, актиномицин D, этопозид, топотекан HCl, тенипозид (VM-26) и иринотекан, а также фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные чего-либо из перечисленного. Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой иринотекан.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный химиотерапевтический агент представляет собой антиметаболит. Антиметаболит представляет собой химическое вещество со структурой, аналогичной структуре метаболита, необходимой для нормальных биохимических реакций, однако отличающейся в достаточной мере, чтобы вмешиваться в одну или более из нормальных функций клеток, например, деление клеток. Антиметаболиты включают, не ограничиваясь перечисленными, гемцитабин, фторурацил, капецитабин, метотрексат натрия, ралтитрексед, пеметрексед, тегафур, цитозинарабинозид, тиогуанин, 5-азацитидин, 6-меркаптопурин, азатиоприн, 6-тиогуанин, пентостатин, фосфат флударабина и кладрибин, а также фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные чего-либо из перечисленного. Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой гемцитабин.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный химиотерапевтический агент представляет собой антимитотический агент, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, агенты, которые связывают тубулин. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент представляет собой так-

сан. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент представляет собой паклитаксел или доцетаксел, или фармацевтически приемлемую соль, кислоту или производное паклитаксела или доцетаксела. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент представляет собой паклитаксел (ТАКСОЛ), доцетаксел (ТАКСОТЕР), альбумин-связанный паклитаксел (АБРАКСАН), DHA-паклитаксел или PG-паклитаксел. Согласно некоторым другим альтернативным вариантам реализации указанный антимитотический агент содержит алкалоид барвинка, такой как винкристин, винбластин, винорелбин или виндезин, или их фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные. Согласно некоторым вариантам реализации указанный антимитотический агент представляет собой ингибитор кинезина Eg5 или ингибитор митотической киназы, такой как Aurora A или Plk1. Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой паклитаксел. Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой альбумин-связанный паклитаксел (АБРАКСАН).

Согласно некоторым вариантам реализации дополнительный терапевтический агент содержит такой агент, как малая молекула. Например, лечение может задействовать комбинированное введение агента согласно настоящему изобретению и малой молекулы, действующей в качестве ингибитора опухолеассоциированных антигенов, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, рЭФР, HER2 (ErbB2) и/или ФРЭС. Согласно некоторым вариантам реализации агент согласно настоящему изобретению вводят в комбинации с ингибитором протеинкиназы, выбранным из группы, состоящей из: гефинитиба (ИРЕССА), эрлотиниба (ТАРЦЕВА), сунитиниба (СУТЕНТ), лапатиниба, вандетаниба (ЗАКТИМА), AEE788, CI-1033, цедираниба (РЕНЕНТИН), сорафениба (НЕКСАВАР) и пазопаниба (GW786034B). Согласно некоторым вариантам реализации дополнительный терапевтический агент содержит ингибитор mTOR.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой агент, который ингибирует путь раковых стволовых клеток. Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой ингибитор пути Notch. Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой ингибитор пути Wnt.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой ингибитор пути BMP. Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой ингибитор пути Hippo. Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой ингибитор пути RSPO/LGR. Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой ингибитор пути mTOR/AKR.

Согласно некоторым вариантам реализации дополнительный терапевтический агент содержит биологическую молекулу, такую как антитело. Например, лечение может задействовать комбинированное введение агента согласно настоящему изобретению и антител против опухолеассоциированных антигенов, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, антител, которые связывают рЭФР, HER2/ErbB2 и/или ФРЭС. Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой антитело, специфическое для маркера стволовых опухолевых клеток. Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой антитело, которое связывает компонент пути Notch. Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой антитело, которое связывает компонент пути Wnt. Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой антитело, которое ингибирует путь раковых стволовых клеток. Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой ингибитор пути Notch. Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой ингибитор пути Wnt. Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой ингибитор пути BMP. Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой антитело, которое ингибирует опосредованную β-катенином сигнализацию. Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой антитело, которое представляет собой ингибитор ангиогенеза (например, антитело против ФРЭС или рецептора ФРЭС). Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой бевацизумаб (АВАСТИН), рамуцирумаб, трастузумаб (ГЕРЦЕПТИН), пертузумаб (ОМНИТАРГ), панитумумаб (ВЕКТИБИКС), нимотузумаб, залутумумаб или цетуксимаб (ЭРБИТУКС).

Согласно некоторым вариантам реализации помимо введения связывающего TIGIT агента, описанного в настоящем документе, указанный способ или лечение дополнительно включает введение по меньшей мере одного дополнительного иммунотерапевтического агента. Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный иммунотерапевтический агент представляет собой агент, стимулирующий иммунный ответ. Согласно некоторым вариантам реализации указанный иммунотерапевтический агент (например, агент, стимулирующий иммунный ответ) включает, не ограничиваясь перечисленными, колониестимулирующий фактор (например, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимули-

рующий фактор (ГМКСФ), макрофагальный колониестимулирующий фактор (МКСФ), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (ГКСФ), фактор стволовых клеток (ФСК)), интерлейкин (например, ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-7, ИЛ-12, ИЛ-15, ИЛ-18), антитело, которое блокирует иммуносупрессивные функции (например, антитело против CTLA4, антитело против CD28, антитело против CD3, антитело против PD-1, антитело против PD-L1), антитело, которое усиливает функции иммунных клеток (например, антитело против GITR или антитело против OX-40), Toll-подобный рецептор (например, TLR4, TLR7, TLR9), растворимый лиганд (например, GITRL или OX-40L) или представитель семейства B7 (например, CD80, CD86). Дополнительный иммунотерапевтический агент (например, агент, стимулирующий иммунный ответ) может вводиться до введения, одновременно с введением или после введения связывающего TIGIT агента. Также предложены фармацевтические композиции, содержащие связывающий TIGIT агент и дополнительный иммунотерапевтический агент (например, агент(ы), стимулирующий(ие) иммунный ответ). Согласно некоторым вариантам реализации указанный иммунотерапевтический агент содержит 1, 2, 3 или более иммунотерапевтических агентов. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент, стимулирующий иммунный ответ, содержит 1, 2, 3 или более стимулирующих иммунный ответ агентов.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой антитело, который представляет собой ингибитор иммунных контрольных точек. Согласно некоторым вариантам реализации указанный ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой антитело против PD-1, антитело против PD-L1, антитело против CTLA4, антитело против CD28, антитело против LAG3, антитело против TIM3, антитело против GITR или антитело против OX-40. Согласно некоторым вариантам реализации указанный ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой антитело против 4-1BB. Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой антитело против PD-1, выбранное из групп, состоящих из: ниволумаба (ОПДИВО), пембролизумаба (КЕЙТРУДА) или пидилизумаба. Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой антитело против PD-1, выбранное из групп, состоящих из: MEDI0680, REGN2810, BGB-A317 и PDR001. Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой антитело против PD-L1, выбранное из группы, состоящей из: BMS935559 (MDX-1105), атезолизумаба (MPDL3280A), дурвалумаба (MEDI4736) или авелумаба (MSB0010718C). Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой антитело против CTLA-4, выбранное из группы, состоящей из: ипилимумаба (ЕРВОЙ) или тремелимумаба. Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой антитело против LAG-3, выбранное из группы, состоящей из: BMS-986016 и LAG525. Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой антитело против OX-40, выбранное из группы, состоящей из: MEDI6469, MEDI0562, и MOXR0916. Согласно некоторым вариантам реализации указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой антитело против 4-1BB, выбранное из группы, состоящей из: PF-05082566.

Кроме того, лечение связывающим TIGIT агентом, описанным в настоящем документе, может включать комбинированное лечение с применением других биологических молекул, например, одного или более цитокинов (например, лимфокинов, интерлейкинов, интерферонов, факторов некроза опухоли и/или факторов роста), или может сопровождаться хирургическим удалением опухолей, удалением раковых клеток или любой другой терапией, проведение которой счел необходимым лечащий врач.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент может вводиться в комбинации с биологической молекулой, выбранной из группы, состоящей из: адреномедуллина (AM), ангиопоэтина (Ang), костных морфогенетических белков (BMP), нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), ЭФР, эритропоэтина (EPO), фактора роста фибробластов (ФРФ), нейротрофного фактора глиальных клеток (GDNF), ГКСФ, ГМКСФ, GDF9, фактора роста гепатоцитов (ФРГ), фактора роста из гепатомы (HDGF), ИФР, стимулирующего миграцию фактора, миостатина (GDF-8), фактора роста нервных клеток (NGF), нейротрофинов, ТРФ, тромбопоэтина, ТФР-α, ТФР-β, ФНО-α, ФРЭС, ПФР (плацентарного фактора роста), ИФН-γ, ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-12, ИЛ-15 и ИЛ-18. Согласно некоторым вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент может вводиться в комбинации с биологической молекулой, выбранной из группы, состоящей из: макрофагального колониестимулирующего фактора (МКСФ) и фактора стволовых клеток (ФСК).

Согласно некоторым вариантам реализации лечение связывающим TIGIT агентом, описанным в настоящем документе, может сопровождаться хирургическим удалением опухолей, удалением раковых клеток или любым другим хирургическим лечением, которое признано необходимым лечащим врачом.

Согласно некоторым вариантам реализации лечение включает введение связывающего TIGIT агента согласно настоящему изобретению в комбинации с лучевой терапией. Лечение агентом может осуществляться до проведения, одновременно с проведением или после проведения лучевой терапии. Схемы дозирования для такой лучевой терапии может определить практикующий медицинский специалист.

Согласно некоторым вариантам реализации лечение включает введение связывающего TIGIT аген-

та согласно настоящему изобретению в комбинации с противовирусной терапией. Лечение агентом может происходить до проведения, одновременно с проведением или после проведения противовирусной терапии. Выбор противовирусного лекарственного средства для применения в комбинированной терапии зависит от вируса, которым инфицирован субъект.

Комбинированное введение может включать совместное введение в одном фармацевтическом составе, или применение отдельных составов, или последовательное введение в любом порядке, однако, как правило, в пределах некоторого периода времени, таким образом, чтобы все активные агенты могли осуществлять свою биологическую активность одновременно.

Следует понимать, что комбинация связывающего TIGIT агента, описанного в настоящем документе, и по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента может вводиться в любом порядке или одновременно. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент вводят пациентам, ранее проходившим лечение вторым терапевтическим агентом. Согласно некоторым другим вариантам реализации указанный связывающий TIGIT агент и второй терапевтический агент вводят по существу одновременно или одновременно. Например, субъект может получать агент во время прохождения курса лечения вторым терапевтическим агентом (например, прохождения химиотерапии). Согласно некоторым вариантам реализации связывающий TIGIT агент вводят в пределах периода продолжительностью 1 год от лечения вторым терапевтическим агентом. Согласно некоторым другим альтернативным вариантам реализации связывающий TIGIT агент вводят в пределах периода продолжительностью 10, 8, 6, 4 или 2 месяца от любого лечения вторым терапевтическим агентом. Согласно некоторым другим вариантам реализации связывающий TIGIT агент вводят в пределах периода 4, 3, 2, или 1 недель от любого лечения вторым терапевтическим агентом. Согласно некоторым вариантам реализации агент вводят в пределах периода 5, 4, 3, 2, или 1 дней от любого лечения вторым терапевтическим агентом. Следует также иметь в виду, что указанные два (или более) агентов или видов лечения могут вводиться указанному субъекту/проводиться у указанного субъекта в пределах нескольких часов или минут (т.е. по существу одновременно).

Подходящая для лечения заболевания дозировка связывающего TIGIT агента согласно настоящему изобретению зависит от типа заболевания, подлежащего лечению, тяжести и течения заболевания, отклика заболевания, от того, вводят ли указанный агент с терапевтической или профилактической цели, предшествующей терапии, клинической истории пациента и т.п., полностью на усмотрение лечащего врача. Указанный связывающий TIGIT агент может вводиться однократно или в ходе курса лечения продолжительностью от нескольких дней до нескольких месяцев, или до достижения излечения или облегчения болезненного состояния (например, снижения размера опухоли). Оптимальные схемы дозирования могут быть рассчитаны на основании измерений накопления лекарственного средства в организме пациента и варьируют в зависимости от относительной активности индивидуального агента. Осуществляющий введение врач может определить оптимальные дозировки, методики дозирования и частоту повторения. Согласно некоторым вариантам реализации дозировка составляет от 0,01 мкг до 100 мг/кг массы тела, от 0,1 мкг до 100 мг/кг массы тела, от 1 мкг до 100 мг/кг массы тела, от 1 мг до 100 мг/кг массы тела, 1 мг до 80 мг/кг массы тела, от 10 мг до 100 мг/кг массы тела, от 10 мг до 75 мг/кг массы тела или от 10 мг до 50 мг/кг массы тела. Согласно некоторым вариантам реализации дозировка указанного агента составляет от приблизительно 0,1 мг до приблизительно 20 мг/кг массы тела. Согласно некоторым вариантам реализации дозировка указанного агента составляет приблизительно 0,5 мг/кг массы тела. Согласно некоторым вариантам реализации дозировка указанного агента составляет приблизительно 1 мг/кг массы тела. Согласно некоторым вариантам реализации дозировка указанного агента составляет приблизительно 1,5 мг/кг массы тела. Согласно некоторым вариантам реализации дозировка указанного агента составляет приблизительно 2 мг/кг массы тела. Согласно некоторым вариантам реализации дозировка указанного агента составляет приблизительно 2,5 мг/кг массы тела. Согласно некоторым вариантам реализации дозировка указанного агента составляет приблизительно 5 мг/кг массы тела. Согласно некоторым вариантам реализации дозировка указанного агента составляет приблизительно 7,5 мг/кг массы тела. Согласно некоторым вариантам реализации дозировка указанного агента составляет приблизительно 10 мг/кг массы тела. Согласно некоторым вариантам реализации дозировка указанного агента составляет приблизительно 12,5 мг/кг массы тела. Согласно некоторым вариантам реализации дозировка указанного агента составляет приблизительно 15 мг/кг массы тела. Согласно некоторым вариантам реализации доза может вводиться один раз или более ежедневно, еженедельно, ежемесячно или ежегодно. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент вводят один раз в неделю, один раз каждые две недели, один раз каждые три недели, или один раз каждые четыре недели.

Согласно некоторым вариантам реализации может вводиться первая более высокая "нагрузочная" доза связывающего TIGIT агента с последующим введением одной или большего количества более низких доз. Согласно некоторым вариантам реализации частота введения также может изменяться. Согласно некоторым вариантам реализации схема дозирования может включать введение первой дозы, за которым следуют дополнительные дозы (или "поддерживающие" дозы) один раз в неделю, один раз каждые две недели, один раз каждые три недели или один раз каждый месяц. Например, схема дозирования может включать введение первой нагрузочной дозы, за которым следует еженедельное введение поддержи-

вающей дозы, составляющей, например, половину указанной первой дозы; либо схема дозирования может включать введение первой нагрузочной дозы, за которым следует введение поддерживающих доз, составляющих, например половину указанной первой дозы, каждую вторую неделю; либо схема дозирования может включать введение трех первых доз в течение 3 недель, за которым следует введение поддерживающих доз, например введение одного и того же количества каждую вторую неделю.

Как известно специалистам в данной области техники, введение любого терапевтического агента может приводить к побочным эффектам и/или токсичности. В некоторых случаях указанные побочные эффекты и/или токсичность являются настолько тяжелыми, что это исключает введение конкретного агента в терапевтически эффективной дозе. В некоторых случаях лекарственную терапию необходимо прекратить и попробовать прибегнуть к другим агентам. Однако многие агенты одного терапевтического класса часто демонстрируют аналогичные побочные эффекты и/или токсичность, что означает, что пациент вынужден либо прекратить терапию, либо, если она возможна, страдать от неприятных побочных эффектов, ассоциированных с терапевтическим агентом.

Согласно некоторым вариантам реализации схема дозирования может быть ограничена специфическим числом введений или "циклов". Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент вводят в ходе 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более циклов. Например, указанный агент вводят каждые 2 недели в 6 циклах, вводят каждые 3 недели в 6 циклах, вводят каждые 2 недели в 4 циклах, вводят каждые 3 недели в 4 циклах и т.п. Схемы дозирования могут быть определены, а затем модифицированы специалистами в данной области техники.

В настоящем изобретении предложены способы введения субъекту связывающих TIGIT агентов, описанных в настоящем документе, включающие применением стратегии прерывистого дозирования для введения одного или более агентов, которые могут снижать побочные эффекты и/или токсичность, ассоциированные с введением агента, химиотерапевтического агента и т.п. Согласно некоторым вариантам реализации способ лечения рака у субъекта-человека включает введение указанному субъекту терапевтически эффективной дозы агента в комбинации с терапевтически эффективной дозой химиотерапевтического агента, при этом один или оба указанных агента вводят в соответствии со стратегией прерывистого дозирования. Согласно некоторым вариантам реализации указанная стратегия прерывистого дозирования включает введение указанному субъекту первой дозы агента и введение последующих доз указанного агента приблизительно каждые 2 недели однократно. Согласно некоторым вариантам реализации указанная стратегия прерывистого дозирования включает введение указанному субъекту первой дозы агента и введение последующих доз указанного агента приблизительно каждые 3 недели однократно. Согласно некоторым вариантам реализации указанная стратегия прерывистого дозирования включает введение указанному субъекту первой дозы агента и введение последующих доз указанного агента приблизительно каждые 4 недели однократно. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент вводят с применением стратегии прерывистого дозирования, а химиотерапевтический агент вводят еженедельно.

В настоящем изобретении предложены композиции, содержащие связывающие TIGIT агенты, описанные в настоящем документе. В настоящем изобретении также предложены фармацевтические композиции, содержащие связывающие TIGIT агенты, описанные в настоящем документе, и фармацевтически приемлемую основу. Согласно некоторым вариантам реализации указанные фармацевтические композиции подходят для применения при иммунотерапии. Согласно некоторым вариантам реализации указанные композиций подходят для применения при ингибировании роста опухоли. Согласно некоторым вариантам реализации указанные фармацевтические композиции подходят для применения при ингибировании роста опухоли у субъекта (например, у пациента-человека). Согласно некоторым вариантам реализации указанные композиции подходят для применения при лечении рака. Согласно некоторым вариантам реализации указанные фармацевтические композиции подходят для применения при лечении рака у субъекта (например, у пациента-человека).

Составы для хранения и применения получают путем комбинирования очищенного антитела или агента согласно настоящему изобретению с фармацевтически приемлемой основой (например, носителем или вспомогательным веществом). Специалисты в данной области техники обычно считают фармацевтически приемлемые носители, вспомогательные вещества и/или стабилизаторы неактивными ингредиентами состава или фармацевтической композиции.

Подходящие фармацевтически приемлемые основы включают, не ограничиваясь перечисленными, нетоксичные буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; соли, такие как хлорид натрия; антиоксиданты, в том числе аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты, такие как октадецилдиметилбензилхлорид аммония, хлорид гексаметония, хлорид бензалкония, хлорид бензетония, фенол, бутил или бензиловый спирт, алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен, катехол, резорцин, циклогексанол, 3-пентанол и м-крезол; полипептиды с низкой молекулярной массой (например, менее чем приблизительно 10 остатков аминокислот); белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; углеводы, такие как моносахариды, дисахариды, глюкоза, манноза или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТК; сахара, такие как

сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы с металлами, такие как белковые комплексы с Zn; и неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN или полиэтиленгликоль (ПЭГ). (Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22st Edition, 2012, Pharmaceutical Press, London.).

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению могут быть введены любыми из ряда способов как местного, так и системного лечения. Введение может осуществляться местно посредством применения эпидермальных или трансдермальных пластырей, мазей, лосьонов, кремов, гелей, капель, суппозиториев, спреев, жидкостей и порошков; через легкие путем ингаляции или инсуффляции порошков или аэрозолей, в том числе посредством небулайзера, внутритрахеально и интраназально; перорально; или парентерально, в том числе внутривенно, внутриартериально, интратуморально (внутрь опухолей), подкожно, внутрибрюшинно, внутримышечно (например, посредством инъекции или инфузии) или интракраниально (например, интратекально или интравентрикулярно).

Указанный терапевтический состав может быть представлен единичной лекарственной формой. Такие составы включают таблетки, пилюли, капсулы, порошки, гранулы, растворы или суспензии в водных или неводных средах, или суппозитории. В твердых композициях, таких как таблетки, основной активный ингредиент смешивают с фармацевтическим носителем. Стандартные ингредиенты для таблетирования включают кукурузный крахмал, лактозу, сахарозу, сорбит, тальк, стеариновую кислоту, стеарат магния, двузамещенный фосфат кальция или камеди и разбавители (например, воду). Указанные ингредиенты могут применяться для формирования твердой предварительной композиции, содержащей гомогенную смесь с соединением согласно настоящему изобретению или его нетоксичной фармацевтически приемлемой солью. Указанную твердую предварительную композицию затем делят на единицы лекарственных форм описанного выше типа. На таблетки, пилюли и т.п. с составом или композицией могут быть нанесены покрытия, или они могут быть иным образом приготовлены с получением лекарственной формы, обеспечивающей преимущество в виде пролонгированного действия. Например, таблетка или пилюля может содержать внутреннюю композицию, покрытую внешним компонентом. Кроме того, указанные два компонента могут быть разделены кишечнорастворимым слоем, который служит для защиты от распадения и обеспечивает прохождение внутреннего компонента в интактном виде через желудок или задержку его высвобождения. Для таких кишечнорастворимых слоев или покрытий могут применяться различные материалы, такие материалы включают ряд полимерных кислот и смесей полимерных кислот с такими материалами, как шеллак, цетиловый спирт и ацетат целлюлозы.

Связывающие TIGIT агенты, описанные в настоящем документе, могут также быть заключены в микрокапсулы. Такие микрокапсулы получают, например, путем техник коацервации или путем межфазной полимеризации, например, гидроксиметилцеллюлозные или желатиновые микрокапсулы и поли(метилметацилатные) микрокапсулы, соответственно, в коллоидных системах доставки лекарственных средств (например, липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и нанокапсулы) или в виде макроэмульсий согласно описанию в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22st Edition, 2012, Pharmaceutical Press, London.

Согласно некоторым вариантам реализации фармацевтические составы включают агент согласно настоящему изобретению в комплексе с липосомами. Способы получения липосом известны специалистам в данной области техники. Например, некоторые липосомы могут быть получены путем обращенно-фазового выпаривания с липидной композицией, содержащей фосфатидилхолин, холестерин и ПЭГ-дериватизированный фосфатидилэтаноламин (ПЭГ-ФЭ). Липосомы могут быть экструдированы через фильтры с заданным размером пор для получения липосом требуемого диаметра.

Согласно некоторым вариантам реализации могут быть получены составы для продолжительного высвобождения, содержащие связывающие TIGIT агенты согласно описанию в настоящем документе. Подходящие примеры составов для продолжительного высвобождения включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащие агент, отличающиеся тем, что указанные матрицы представлены в виде формованных изделий (например, пленок или микрокапсул). Примеры матриц для продолжительного высвобождения включают сложные полиэфиры, гидрогели, такие как поли(2-гидроксиэтилметакрилат) или поли(виниловый спирт), полилактиды, сополимеры L-глутаминовой кислоты и 7-этил-L-глутамата, неразлагающийся этиленвинилацетат, разлагающиеся сополимеры молочной кислоты/гликолевой кислоты, такие как LUPRON DEPOT™ (инъецируемые микросферы, состоящие из сополимера молочной кислоты/гликолевой кислоты и лейпролида ацетата), сахарозы ацетат изобутират и поли-D-(-)-3-гидроксимасляная кислота.

V. Выбранные варианты реализации.

Согласно варианту реализации 1 предложено выделенное антитело, специфически связывающее внеклеточный домен TIGIT, которое содержит: (a) CDR1 тяжелой цепи, содержащий GSSLSSSYMS (SEQ ID NO: 7) или GFSLSSSYMS (SEQ ID NO: 13), CDR2 тяжелой цепи, содержащий IIGSNGNTYYANWAKG (SEQ ID NO: 8), и CDR3 тяжелой цепи, содержащий GGYRTSGMDP (SEQ ID NO: 9), и/или (b) CDR1 легкой цепи, содержащий QASQSISSYLNW (SEQ ID NO: 10), QASQSNIYSDLAW (SEQ ID NO: 14) или QASQNIYSDLAW (SEQ ID NO: 81), CDR2 легкой цепи, содержащий DALKLAS (SEQ ID NO: 11) или RASTLAS (SEQ ID NO: 15), и CDR3 легкой цепи, содержащий QQEHSVGNVDN (SEQ ID

NO: 12) или QQEHLVAWIYN (SEQ ID NO: 16).

Согласно варианту реализации 2 антитело согласно варианту реализации 1 содержит: (a) CDR1 тяжелой цепи, содержащий GSSLSSSYMS (SEQ ID NO: 7), CDR2 тяжелой цепи, содержащий IIGSNGNTYYANWAKG (SEQ ID NO: 8), и CDR3 тяжелой цепи, содержащий GGYRTSGMDP (SEQ ID NO: 9), и/или (b) CDR1 легкой цепи, содержащий QASQSISSYLNW (SEQ ID NO: 10), CDR2 легкой цепи, содержащий DALKLAS (SEQ ID NO: 11), и CDR3 легкой цепи, содержащий QQEHSVGNVDN (SEQ ID NO: 12).

Согласно варианту реализации 3 антитело согласно варианту реализации 1 содержит: (a) CDR1 тяжелой цепи, содержащий GFSLSSSYMS (SEQ ID NO: 13), CDR2 тяжелой цепи, содержащий IIGSNGNTYYANWAKG (SEQ ID NO: 8), и CDR3 тяжелой цепи, содержащий GGYRTSGMDP (SEQ ID NO: 9); и/или (b) CDR1 легкой цепи, содержащий QASQNIYSDLAW (SEQ ID NO: 81), CDR2 легкой цепи, содержащий RASTLAS (SEQ ID NO: 15), и CDR3 легкой цепи, содержащий QQEHLVAWIYN (SEQ ID NO: 16).

Согласно варианту реализации 4 выделенное антитело, специфически связывающее TIGIT, содержит: (a) вариабельную область тяжелой цепи, отличающуюся по меньшей мере 90% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO: 32; и/или (b) вариабельную область легкой цепи, отличающуюся по меньшей мере 90% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 20.

Согласно варианту реализации 5 антитело согласно любому из вариантов реализации 1-4 содержит: (a) вариабельную область тяжелой цепи, отличающуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO: 32; и/или (b) вариабельную область легкой цепи, отличающуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 20.

Согласно варианту реализации 6 антитело согласно варианту реализации 5 содержит: (a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 17; и (b) вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 18.

Согласно варианту реализации 7 антитело согласно варианту реализации 5 содержит: (a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 19; и (b) вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 20.

Согласно варианту реализации 8 антитело согласно варианту реализации 5 содержит: (a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 32; и (b) вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 20.

Согласно варианту реализации 9 антитело согласно любому из вариантов реализации 1-8 представляет собой моноклональное антитело.

Согласно варианту реализации 10 антитело согласно любому из вариантов реализации 1-9 представляет собой гуманизированное антитело.

Согласно варианту реализации 11 антитело согласно любому из вариантов реализации 1-9 представляет собой антитело человека.

Согласно варианту реализации 12 антитело согласно любому из вариантов реализации 1-10 представляет собой рекомбинантное антитело или а химерное антитело.

Согласно варианту реализации 13 антитело согласно любому из вариантов реализации 1-12 представляет собой биспецифическое антитело.

Согласно варианту реализации 14 антитело согласно любому из вариантов реализации 1-13 представляет собой фрагмент антитела, содержащий антигенсвязывающий сайт.

Согласно варианту реализации 15 антитело согласно любому из вариантов реализации 1-13 представляет собой антитело IgG.

Согласно варианту реализации 16 антитело согласно варианту реализации 15 представляет собой антитело IgG1, антитело IgG2 или антитело IgG4.

Согласно варианту реализации 17 антитело содержит: (a) последовательность аминокислот тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 34 и SEQ ID NO: 56; и (b) последовательность аминокислот легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 30.

Согласно варианту реализации 18 антитело согласно варианту реализации 17 содержит последовательность аминокислот тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 26, и последовательность аминокислот легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 28.

Согласно варианту реализации 19 антитело согласно варианту реализации 17 содержит последовательность аминокислот тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 27, и последовательность аминокислот легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 28.

Согласно варианту реализации 20 антитело согласно варианту реализации 17 содержит последовательность аминокислот тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 29, и последовательность аминокислот легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 30.

Согласно варианту реализации 21 антитело согласно варианту реализации 17 содержит последова-

тельность аминокислот тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 34, и последовательность аминокислот легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 30.

Согласно варианту реализации 22 антитело согласно варианту реализации 17 содержит последовательность аминокислот тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 56, и последовательность аминокислот легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 30.

Согласно варианту реализации 23 антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи из антитела, выбранного из группы, состоящей из: 313R11, 313R12, 313R14, 313R19 и 313R20.

Согласно варианту реализации 24 антитело выбрано из группы, состоящей из: 313R11, 313R12, 313R14, 313R19 и 313R20.

Согласно варианту реализации 25 антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, кодируемую плазмидой, депонированной в ATCC под номером PTA-122180.

Согласно варианту реализации 26 антитело содержит вариабельную область легкой цепи, кодируемую плазмидой, депонированной в ATCC под номером PTA-122181.

Согласно варианту реализации 27 антитело содержит полипептид, содержащий вариабельную область тяжелой цепи, кодируемую плазмидой, депонированной в ATCC под номером PTA-121180.

Согласно варианту реализации 28 антитело содержит полипептид, содержащий вариабельную область легкой цепи, кодируемую плазмидой, депонированной в ATCC под номером PTA-122181.

Согласно варианту реализации 29 антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, кодируемую плазмидой, депонированной в ATCC под номером PTA-122180, и вариабельную область легкой цепи, кодируемую плазмидой, депонированной в ATCC под номером PTA-122181.

Согласно варианту реализации 30 антитело содержит полипептид, кодируемый плазмидой, депонированной в ATCC под номером PTA-122180, и плазмидой, депонированной в ATCC под номером PTA-122181.

Согласно варианту реализации 31 выделенное антитело конкурирует с антителом согласно любому из вариантов реализации 1-30 за специфическое связывание с TIGIT.

Согласно варианту реализации 32 выделенное антитело связывает тот же эпитоп на TIGIT, что и антитело согласно любому из вариантов реализации 1-30.

Согласно варианту реализации 33 выделенное антитело связывает эпитоп на TIGIT, перекрывающийся с эпитопом на TIGIT, который связывает антитело согласно любому из вариантов реализации 1-30.

Согласно варианту реализации 34 антитело согласно любому из вариантов реализации 1-33 ингибирует связывание TIGIT с рецептором полиовируса (PVR).

Согласно варианту реализации 35 антитело согласно любому из вариантов реализации 1-33 ингибирует или блокирует взаимодействие между TIGIT и PVR.

Согласно варианту реализации 36 антитело согласно любому из вариантов реализации 1-33 ингибирует сигнализацию TIGIT.

Согласно варианту реализации 37 антитело согласно любому из вариантов реализации 1-33 представляет собой антагонист опосредованной TIGIT сигнализации.

Согласно варианту реализации 38 антитело согласно любому из вариантов реализации 1-33 ингибирует активацию TIGIT.

Согласно варианту реализации 39 антитело согласно любому из вариантов реализации 1-33 ингибирует фосфорилирование TIGIT.

Согласно варианту реализации 40 антитело согласно любому из вариантов реализации 1-33 снижает экспрессию TIGIT на поверхности клеток.

Согласно варианту реализации 41 антитело согласно любому из вариантов реализации 1-33 индуцирует и/или усиливает иммунный ответ.

Согласно варианту реализации 42 предложено антитело согласно варианту реализации 41, характеризующееся тем, что указанный иммунный ответ направлен на опухоль или опухолевую клетку.

Согласно варианту реализации 43 предложено антитело согласно варианту реализации 41, характеризующееся тем, что указанный иммунный ответ направлен на вирус или инфицированную вирусом клетку.

Согласно варианту реализации 44 антитело согласно любому из вариантов реализации 1-33 повышает клеточный иммунитет.

Согласно варианту реализации 45 антитело согласно любому из вариантов реализации 1-33 повышает Т-клеточную активность.

Согласно варианту реализации 46 антитело согласно любому из вариантов реализации 1-33 повышает цитолитическую Т-клеточную (CTL) активность.

Согласно варианту реализации 47 антитело согласно любому из вариантов реализации 1-33 повышает активность естественных клеток-киллеров (NK).

Согласно варианту реализации 48 антитело согласно любому из вариантов реализации 1-33, которое увеличивает продуцирование ИЛ-2 и/или число продуцирующих ИЛ-2 клеток.

Согласно варианту реализации 49 антитело согласно любому из вариантов реализации 1-33 увели-

чивает продуцирование ИФН-γ и/или число продуцирующих ИФН-γ клеток.

Согласно варианту реализации 50 антитело согласно любому из вариантов реализации 1-33 повышает иммунный ответ Th1-типа.

Согласно варианту реализации 51 антитело согласно любому из вариантов реализации 1-33 уменьшает продуцирование ИЛ-4 и/или число продуцирующих ИЛ-4 клеток.

Согласно варианту реализации 52 антитело согласно любому из вариантов реализации 1-33 уменьшает ИЛ-10 и/или число продуцирующих ИЛ-10 клеток.

Согласно варианту реализации 53 антитело согласно любому из вариантов реализации 1-33 снижает иммунный ответ Th2-типа.

Согласно варианту реализации 54 антитело согласно любому из вариантов реализации 1-33 ингибирует и/или снижает супрессорную активность регуляторных Т-клеток (Treg).

Согласно варианту реализации 55 антитело согласно любому из вариантов реализации 1-33 ингибирует и/или снижает супрессорную активность супрессорных клеток миелоидного происхождения (клеток СКМП).

Согласно варианту реализации 56 антитело согласно любому из вариантов реализации 1-55 ингибирует рост опухоли.

Согласно варианту реализации 57 гетеродимерный агент содержит антитело согласно любому из вариантов реализации 1-33.

Согласно варианту реализации 58 биспецифический агент содержит a) первое плечо, которое специфически связывает TIGIT, и b) второе плечо, при этом указанное первое плечо содержит антитело согласно любому из вариантов реализации 1-33.

Согласно варианту реализации 59 предложен биспецифический агент согласно варианту реализации 58, характеризующийся тем, что указанное второе плечо содержит антигенсвязывающий сайт из антитела.

Согласно варианту реализации 60 предложен биспецифический агент согласно варианту реализации 58, характеризующийся тем, что указанное второе плечо специфически связывает PD-1, PD-L1, CTLA4, TIM-3, LAG-3, OX-40 или GITR.

Согласно варианту реализации 61 предложен биспецифический агент согласно варианту реализации 58, характеризующийся тем, что указанное второе плечо специфически связывает опухолевый антиген.

Согласно варианту реализации 62 предложен биспецифический агент согласно варианту реализации 58, характеризующийся тем, что указанное второе плечо содержит стимулирующий иммунный ответ агент.

Согласно варианту реализации 63 предложен биспецифический агент согласно варианту реализации 62, характеризующийся тем, что указанный агент, стимулирующий иммунный ответ, выбран из группы, состоящей из: гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМКСФ), макрофагального колониестимулирующего фактора (МКСФ), гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (ГКСФ), интерлейкина 2 (ИЛ-2), интерлейкина 3 (ИЛ-3), интерлейкина 12 (ИЛ-12), интерлейкина 15 (ИЛ-15), B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), лиганда 4-1BB, GITRL, OX-40L, антитела против CD3, антитела против CTLA4, антитела против PD-1, антитела против PD-L1, антитела против GITR, антитела против OX-40, антитела против LAG-3 и антитела против TIM-3.

Согласно варианту реализации 64 предложен биспецифический агент согласно любому из вариантов реализации 58-63, при этом указанное первое плечо содержит первый CH3-домен, а указанное второе плечо содержит второй CH3-домен, каждый из которых модифицирован таким образом, чтобы стимулировать образование гетеродимеров.

Согласно варианту реализации 65 предложен биспецифический агент согласно варианту реализации 64, характеризующийся тем, что указанные первый и второй CH3-домены модифицированы на основании электростатических эффектов.

Согласно варианту реализации 66 предложен биспецифический агент согласно любому из вариантов реализации 58-63, при этом указанное первое плечо содержит первую константную область IgG1 человека с заменами аминокислот в положениях, соответствующих положениям 253 и 292 последовательности SEQ ID NO: 41, при этом указанные аминокислоты заменены на глутамат или аспартат, а указанное второе плечо содержит вторую константную область IgG1 человека с заменами аминокислот в положениях, соответствующих положениям 240 и 282 последовательности SEQ ID NO: 41, при этом указанные аминокислоты заменены на лизин.

Согласно варианту реализации 67 предложен биспецифический агент согласно любому из вариантов реализации 58-63, при этом указанное первое плечо содержит первую константную область IgG1 человека с заменами аминокислот в положениях, соответствующих положениям 240 и 282 последовательности SEQ ID NO: 41, при этом указанные аминокислоты заменены на лизин, а указанное второе плечо содержит вторую константную область IgG1 человека с заменами аминокислот в положениях, соответствующих положениям 253 и 292 последовательности SEQ ID NO: 41, при этом указанные аминокислоты заменены на глутамат или аспартат.

Согласно варианту реализации 68 предложен биспецифический агент согласно любому из вариан-

тов реализации 58-63, при этом указанное первое плечо содержит первую константную область IgG2 человека с заменами аминокислот в положениях, соответствующих положениям 249 и 288 последовательности SEQ ID NO: 42, при этом указанные аминокислоты заменены на глутамат или аспартат, а указанное второе плечо содержит вторую константную область IgG2 человека с заменами аминокислот в положениях, соответствующих положениям 236 и 278 последовательности SEQ ID NO: 42, при этом указанные аминокислоты заменены на лизин.

Согласно варианту реализации 69 предложен биспецифический агент согласно любому из вариантов реализации 58-63, при этом указанное первое плечо содержит первую константную область IgG2 человека с заменами аминокислот в положениях, соответствующих положениям 236 и 278 последовательности SEQ ID NO: 42, при этом указанные аминокислоты заменены на лизин, а указанное второе плечо содержит вторую константную область IgG2 человека с заменами аминокислот в положениях, соответствующих положениям 249 и 288 последовательности SEQ ID NO: 42, при этом указанные аминокислоты заменены на глутамат или аспартат.

Согласно варианту реализации 70 предложен биспецифический агент согласно варианту реализации 64, характеризующийся тем, что указанные первый и второй CH3-домены модифицированы с применением принципа "выступы-во-впадины".

Согласно варианту реализации 71 биспецифический агент согласно любому из вариантов реализации 58-70 ингибирует связывание TIGIT с PVR.

Согласно варианту реализации 72 биспецифический агент согласно любому из вариантов реализации 58-70 ингибирует или блокирует взаимодействие между TIGIT и PVR.

Согласно варианту реализации 73 биспецифический агент согласно любому из вариантов реализации 58-70 ингибирует сигнализацию TIGIT.

Согласно варианту реализации 74 биспецифический агент согласно любому из вариантов реализации 58-70 представляет собой антагонист опосредованной TIGIT сигнализации.

Согласно варианту реализации 75 биспецифический агент согласно любому из вариантов реализации 58-70 ингибирует активацию TIGIT.

Согласно варианту реализации 76 биспецифический агент согласно любому из вариантов реализации 58-70 ингибирует фосфорилирование TIGIT.

Согласно варианту реализации 77 биспецифический агент согласно любому из вариантов реализации 58-70 снижает экспрессию TIGIT на поверхности клеток.

Согласно варианту реализации 78 биспецифический агент согласно любому из вариантов реализации 58-70 индуцирует и/или усиливает иммунный ответ.

Согласно варианту реализации 79 предложен биспецифический агент согласно варианту реализации 78, характеризующийся тем, что указанный иммунный ответ направлен на опухоль или опухолевую клетку.

Согласно варианту реализации 80 предложен биспецифический агент согласно варианту реализации 78, характеризующийся тем, что указанный иммунный ответ направлен на вирус или инфицированную вирусом клетку.

Согласно варианту реализации 81 биспецифический агент согласно любому из вариантов реализации 58-70 повышает клеточный иммунитет.

Согласно варианту реализации 82 биспецифический агент согласно любому из вариантов реализации 58-70 повышает Т-клеточную активность.

Согласно варианту реализации 83 биспецифический агент согласно любому из вариантов реализации 58-70 повышает CTL-активность.

Согласно варианту реализации 84 биспецифический агент согласно любому из вариантов реализации 58-70 повышает активность NK-клеток.

Согласно варианту реализации 85 биспецифический агент согласно любому из вариантов реализации 58-70 увеличивает продуцирование ИЛ-2 и/или число продуцирующих ИЛ-2 клеток.

Согласно варианту реализации 86 биспецифический агент согласно любому из вариантов реализации 58-70 увеличивает продуцирование ИФН-γ и/или число продуцирующих ИФН-γ клеток.

Согласно варианту реализации 87 биспецифический агент согласно любому из вариантов реализации 58-70 повышает иммунный ответ Th1-типа.

Согласно варианту реализации 88 биспецифический агент согласно любому из вариантов реализации 58-70 уменьшает продуцирование ИЛ-4 и/или число продуцирующих ИЛ-4 клеток.

Согласно варианту реализации 89 предложен биспецифический агент согласно любому из вариантов реализации 58-70, который уменьшает ИЛ-10 и/или число продуцирующих ИЛ-10 клеток.

Согласно варианту реализации 90 биспецифический агент согласно любому из вариантов реализации 58-70 снижает иммунный ответ Th2-типа.

Согласно варианту реализации 91 биспецифический агент согласно любому из вариантов реализации 58-70 ингибирует и/или снижает супрессорную активность клеток Treg.

Согласно варианту реализации 92 биспецифический агент согласно любому из вариантов реализации 58-70 ингибирует и/или снижает супрессорную активность клеток СКМП.

Согласно варианту реализации 93 биспецифический агент согласно любому из вариантов реализации 58-92 ингибирует рост опухоли.

Согласно варианту реализации 94, полипептид содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 55 и SEQ ID NO: 56.

Согласно варианту реализации 95 клетка содержит или продуцирует антитело, биспецифический агент или полипептид согласно любому из вариантов реализации 1-94.

Согласно варианту реализации 96 композиция содержит антитело, биспецифический агент или полипептид согласно любому из вариантов реализации 1-94.

Согласно варианту реализации 97 фармацевтическая композиция содержит антитело, биспецифический агент или полипептид согласно любому из вариантов реализации 1-94, и фармацевтически приемлемый носитель.

Согласно варианту реализации 98 выделенная молекула полинуклеотида содержит полинуклеотид, который кодирует антитело, биспецифический агент или полипептид согласно любому из вариантов реализации 1-94.

Согласно варианту реализации 99 вектор содержит полинуклеотид согласно варианту реализации 98.

Согласно варианту реализации 100 выделенная клетка содержит полинуклеотид согласно варианту реализации 98 или вектор согласно варианту реализации 99.

Согласно варианту реализации 101 способ индукции иммунного ответа, активации иммунного ответа, стимуляции иммунного ответа, повышения, усиления или увеличения продолжительности иммунного ответа у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества антитела, биспецифического агента или полипептида согласно любому из вариантов реализации 1-94.

Согласно варианту реализации 102 предложен способ индукции иммунного ответа, активации иммунного ответа, стимуляции иммунного ответа, повышения, усиления или увеличения продолжительности иммунного ответа у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества антитела согласно любому из вариантов реализации 1-33.

Согласно варианту реализации 103 предложен способ согласно варианту реализации 101 или варианту реализации 102, характеризующийся тем, что указанный иммунный ответ направлен против опухоли или рака.

Согласно варианту реализации 104 предложен способ ингибирования роста опухолевых клеток, характеризующийся тем, что указанный способ включает приведение указанных опухолевых клеток в контакт с эффективным количеством антитела, биспецифического агента или полипептида согласно любому из вариантов реализации 1-94.

Согласно варианту реализации 105 предложен способ ингибирования роста опухоли у субъекта, характеризующийся тем, что указанный способ включает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества антитела, биспецифического агента или полипептида согласно любому из вариантов реализации 1-94.

Согласно варианту реализации 106 предложен способ ингибирования роста опухоли у субъекта, характеризующийся тем, что указанный способ включает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества антитела согласно любому из вариантов реализации 1-33.

Согласно варианту реализации 107 предложен способ согласно любому из вариантов реализации 103-106, характеризующийся тем, что указанная опухоль или опухолевая клетка выбрана из группы, состоящей из опухоли ободочной и прямой кишки, опухоли яичника, опухоли поджелудочной железы, опухоли легкого, опухоли печени, опухоли молочной железы, опухоли почки, опухоли предстательной железы, опухоли желудочно-кишечного тракта, меланомы, опухоли шейки матки, опухоли мочевого пузыря, глиобластомы и опухоли головы и шеи.

Согласно варианту реализации 108 предложен способ лечения рака у субъекта, характеризующийся тем, что указанный способ включает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества антитела, биспецифического агента или полипептида согласно любому из вариантов реализации 1-94.

Согласно варианту реализации 109 предложен способ лечения рака у субъекта, характеризующийся тем, что указанный способ включает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества антитела согласно любому из вариантов реализации 1-33.

Согласно варианту реализации 110 предложен способ согласно варианту реализации 108 или варианту реализации 109, характеризующийся тем, что указанный рак выбран из группы, состоящей из рака ободочной и прямой кишки, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака легкого, рака печени, рака молочной железы, рака почки, рака предстательной железы, рака желудочно-кишечного тракта, меланомы, рака шейки матки, рака мочевого пузыря, глиобластомы и рака головы и шеи.

Согласно варианту реализации 111 предложен способ согласно любому из вариантов реализации 101-110, который дополнительно включает введение по меньшей мере одного дополнительного терапев-

тического агента.

Согласно варианту реализации 112 предложен способ согласно варианту реализации 111, характеризующийся тем, что указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент.

Согласно варианту реализации 113 предложен способ согласно варианту реализации 111, характеризующийся тем, что указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой антитело.

Согласно варианту реализации 114 предложен способ согласно варианту реализации 111, характеризующийся тем, что указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой антитело против PD-1, антитело против PD-L1, антитело против CTLA4, антитело против LAG-3 или антитело против TIM-3.

Согласно варианту реализации 115 предложен способ согласно варианту реализации 111, характеризующийся тем, что указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой агент, стимулирующий иммунный ответ.

Согласно варианту реализации 116 предложен способ согласно варианту реализации 115, характеризующийся тем, что указанный агент, стимулирующий иммунный ответ, выбран из группы, состоящей из: ГМКСФ, МКСФ, ГКСФ, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-12, ИЛ-15, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), лиганда 4-1BB, GITRL, лиганда OX-40, антитела против CD3, антитела против CTLA4, антитела против PD-1, антитела против PD-L1, антитела против GITR, антитела против OX-40, антитела против LAG-3 и антитела против TIM-3.

Согласно варианту реализации 117 предложен способ согласно варианту реализации 111, характеризующийся тем, что указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой ингибитор пути Notch, пути Wnt или пути RSPO/LGR.

Согласно варианту реализации 118, способ согласно любому из вариантов реализации 101-103 или 105-117, характеризующийся тем, что указанный субъект представляет собой человека.

Согласно варианту реализации 119, способ согласно любому из вариантов реализации 101-103 или 105-118, характеризующийся тем, что у указанного субъекта была удалена опухоль или был удален рак.

Согласно варианту реализации 120, способ согласно любому из вариантов реализации 101-119, характеризующийся тем, что указанная опухоль или указанный рак экспрессирует PD-L1.

Согласно варианту реализации 121, способ согласно любому из вариантов реализации 101-120, дополнительно включающий этап определения уровня экспрессии PD-L1 в указанной опухоли или указанном раке.

Согласно варианту реализации 122 предложен способ согласно варианту реализации 121, характеризующийся тем, что определение уровня экспрессии PD-L1 выполняют до лечения или контакта с антителом.

Согласно варианту реализации 123 предложен способ согласно варианту реализации 121 или варианту реализации 122, характеризующийся тем, что в том случае, если указанная опухоль или указанный рак характеризуется повышенным уровнем экспрессии PD-L1, указанное антитело, указанный биспецифический агент или полипептид: (a) вводят указанному субъекту; или (b) приводят в контакт с указанной опухолью или опухолевой клеткой.

Согласно варианту реализации 124 предложена плазмида, депонированная в ATCC, которой присвоен номер PTA-122180.

Согласно варианту реализации 125 предложена плазмида, депонированная в ATCC, которой присвоен номер PTA-122181.

Согласно варианту реализации 126 предложено выделенное антитело, специфически связывающее внеклеточный домен TIGIT человека, которое содержит: (a) CDR1 тяжелой цепи, содержащий TSDYAWN (SEQ ID NO: 57), CDR2 тяжелой цепи, содержащий YISYSGSTSYNPSLRS (SEQ ID NO: 58), и CDR3 тяжелой цепи, содержащий ARRQVGLGFAY (SEQ ID NO: 59), и/или (b) CDR1 легкой цепи, содержащий KASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 60), CDR2 легкой цепи, содержащий SASYRYT (SEQ ID NO: 61), и CDR3 легкой цепи, содержащий QQHYSTP (SEQ ID NO: 62).

Согласно варианту реализации 127 предложено выделенное антитело, специфически связывающее TIGIT человека, которое содержит: (a) вариабельную область тяжелой цепи, отличающуюся по меньшей мере 90% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 63 или SEQ ID NO: 67; и/или (b) вариабельную область легкой цепи, отличающуюся по меньшей мере 90% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 64 или SEQ ID NO: 68.

Согласно варианту реализации 128 антитело согласно варианту реализации 126 или варианту реализации 127 содержит: (a) вариабельную область тяжелой цепи, отличающуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 63 или SEQ ID NO: 67; и/или (b) вариабельную область легкой цепи, отличающуюся по меньшей мере 95% идентичностью последовательности SEQ ID NO: 64 или SEQ ID NO: 68.

Согласно варианту реализации 129 антитело согласно варианту реализации 128 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 63, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 64.

Согласно варианту реализации 130 антитело согласно варианту реализации 128 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 67, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 68.

Согласно варианту реализации 131 антитело согласно любому из вариантов реализации 126-130 представляет собой моноклональное антитело.

Согласно варианту реализации 132 антитело согласно любому из вариантов реализации 126-128, 130 или 131 представляет собой гуманизированное антитело.

Согласно варианту реализации 133 антитело согласно варианту реализации 126 представляет собой антитело человека.

Согласно варианту реализации 134 антитело согласно любому из вариантов реализации 126-133 представляет собой рекомбинантное антитело или химерное антитело.

Согласно варианту реализации 135 антитело согласно любому из вариантов реализации 126-134 представляет собой биспецифическое антитело.

Согласно варианту реализации 136 антитело согласно любому из вариантов реализации 126-135 представляет собой фрагмент антитела, содержащий антиген связывающий сайт.

Согласно варианту реализации 137 антитело согласно любому из вариантов реализации 126-136 представляет собой антитело IgG.

Согласно варианту реализации 138 антитело согласно варианту реализации 137 представляет собой антитело IgG1, антитело IgG2 или антитело IgG4.

Согласно варианту реализации 139 предложено антитело, содержащее последовательность аминокислот тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 70, и последовательность аминокислот легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 72.

Согласно варианту реализации 140 предложено антитело, содержащее те же последовательности аминокислот вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, что и антитело 313M32.

Согласно варианту реализации 141 предложено антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, кодируемую плазмидой, депонированной в ATCC под номером PTA-122346.

Согласно варианту реализации 142 предложено антитело, содержащее вариабельную область легкой цепи, кодируемую плазмидой, депонированной в ATCC под номером PTA-122347.

Согласно варианту реализации 143 предложено антитело, содержащее легкую цепь, кодируемую плазмидой, депонированной в ATCC под номером PTA-122347.

Согласно варианту реализации 144 предложено антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, кодируемую плазмидой, депонированной в ATCC под номером PTA-122346, и вариабельную область легкой цепи, кодируемую плазмидой, депонированной в ATCC под номером PTA-122347.

Согласно варианту реализации 145 предложено антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, кодируемую плазмидой, депонированной в ATCC под номером PTA-122346, и легкую цепь, кодируемую плазмидой, депонированной в ATCC под номером PTA-122347.

Согласно варианту реализации 146 антитело согласно любому из вариантов реализации 126-145 не связывает: (a) TIGIT мыши; (b) TIGIT крысы; (c) TIGIT яванского макака; и/или (d) TIGIT макака-резуса.

Согласно варианту реализации 147 предложено выделенное антитело, которое конкурирует с антителом согласно любому из вариантов реализации 126-146 за специфическое связывание с TIGIT.

Согласно варианту реализации 148 предложено выделенное антитело, которое связывает тот же эпитоп на TIGIT, что и антитело согласно любому из вариантов реализации 126-146.

Согласно варианту реализации 149 предложено выделенное антитело, которое связывает эпитоп на TIGIT, перекрывающийся с эпитопом на TIGIT, который связывает антитело согласно любому из вариантов реализации 126-146.

Согласно варианту реализации 150 предложено выделенное антитело, специфически связывающее TIGIT человека, характеризующееся тем, что указанное антитело связывает эпитоп, содержащий: (a) аминокислоты, входящие в состав последовательности SEQ ID NO: 79; (b) аминокислоты, входящие в состав последовательности SEQ ID NO: 80; (c) аминокислоты, входящие в состав последовательностей SEQ ID NO: 79 и SEQ ID NO: 80; (d) аминокислоты Q62 и I109 последовательности SEQ ID NO: 4; (e) аминокислоты Q62 и T119 последовательности SEQ ID NO: 4; (f) аминокислоты Q64 и I109 последовательности SEQ ID NO: 4; (g) аминокислоты Q64 и T119 последовательности SEQ ID NO: 4; (h) аминокислоты Q62, Q64 и I109 последовательности SEQ ID NO: 4; (i) аминокислоты Q62, Q64 и T119 последовательности SEQ ID NO: 4; (j) аминокислоты Q62, I109 и T119 последовательности SEQ ID NO: 4; (k) аминокислоты Q64, I109 и T119 последовательности SEQ ID NO: 4; или (1) аминокислоты Q62, Q64, I109 и T119 последовательности SEQ ID NO: 4.

Согласно варианту реализации 151 предложено антитело согласно варианту реализации 150, характеризующееся тем, что указанное антитело связывает эпитоп, содержащий аминокислоты, входящие в состав последовательностей SEQ ID NO: 79 и SEQ ID NO: 80.

Согласно варианту реализации 152 предложено антитело согласно варианту реализации 150, характеризующееся тем, что указанное антитело связывает эпитоп, содержащий по меньшей мере что-либо

одно из аминокислот N58, E60, Q62, Q64, L65, F107, I109, H111, T117, T119 и G120 последовательности SEQ ID NO: 4.

Согласно варианту реализации 153 предложено антитело согласно любому из вариантов реализации 150-152, характеризующееся тем, что указанный эпитоп представляет собой конформационный эпитоп.

Согласно варианту реализации 154 антитело согласно любому из вариантов реализации 126-153 ингибирует связывание TIGIT с рецептором полиовируса (PVR).

Согласно варианту реализации 155 антитело согласно любому из вариантов реализации 126-153 ингибирует или блокирует взаимодействие между TIGIT и PVR.

Согласно варианту реализации 156 антитело согласно любому из вариантов реализации 126-153 ингибирует сигнализацию TIGIT.

Согласно варианту реализации 157 антитело согласно любому из вариантов реализации 126-153 представляет собой антагонист опосредованной TIGIT сигнализации.

Согласно варианту реализации 158 антитело согласно любому из вариантов реализации 126-153 ингибирует активацию TIGIT.

Согласно варианту реализации 159 антитело согласно любому из вариантов реализации 126-153 ингибирует фосфорилирование TIGIT.

Согласно варианту реализации 160 антитело согласно любому из вариантов реализации 126-153 снижает экспрессию TIGIT на поверхности клеток.

Согласно варианту реализации 161 антитело согласно любому из вариантов реализации 126-153 индуцирует и/или усиливает иммунный ответ.

Согласно варианту реализации 162 предложено антитело согласно варианту реализации 161, характеризующееся тем, что указанный иммунный ответ направлен на опухоль или опухолевую клетку.

Согласно варианту реализации 163 антитело согласно любому из вариантов реализации 126-153 повышает клеточный иммунитет.

Согласно варианту реализации 164 антитело согласно любому из вариантов реализации 126-153 повышает Т-клеточную активность.

Согласно варианту реализации 165 антитело согласно любому из вариантов реализации 126-153 повышает цитолитическую Т-клеточную (CTL) активность.

Согласно варианту реализации 166 антитело согласно любому из вариантов реализации 126-153 повышает активность естественных клеток-киллеров (NK).

Согласно варианту реализации 167 антитело согласно любому из вариантов реализации 126-153 увеличивает продуцирование ИЛ-2 и/или число продуцирующих ИЛ-2 клеток.

Согласно варианту реализации 168 антитело согласно любому из вариантов реализации 126-153 увеличивает продуцирование ИФН-γ и/или число продуцирующих ИФН-γ клеток.

Согласно варианту реализации 169 антитело согласно любому из вариантов реализации 126-153 повышает иммунный ответ Th1-типа.

Согласно варианту реализации 170 антитело согласно любому из вариантов реализации 126-153 уменьшает продуцирование ИЛ-4 и/или число продуцирующих ИЛ-4 клеток.

Согласно варианту реализации 171 антитело согласно любому из вариантов реализации 126-153 уменьшает продуцирование ИЛ-10 и/или число продуцирующих ИЛ-10 клеток.

Согласно варианту реализации 172 антитело согласно любому из вариантов реализации 126-153 снижает иммунный ответ Th2-типа.

Согласно варианту реализации 173 антитело согласно любому из вариантов реализации 126-153 ингибирует и/или снижает супрессорную активность регуляторных Т-клеток (Treg).

Согласно варианту реализации 174 антитело согласно любому из вариантов реализации 126-153 ингибирует и/или снижает супрессорную активность супрессорных клеток миелоидного происхождения (клеток СКМП).

Согласно варианту реализации 175 антитело согласно любому из вариантов реализации 126-174 ингибирует рост опухоли.

Согласно варианту реализации 176 предложен гетеродимерный агент, который содержит антитело согласно любому из вариантов реализации 126-146.

Согласно варианту реализации 177 предложен биспецифический агент, содержащий: a) первое плечо, которое специфически связывает TIGIT, и b) второе плечо, при этом указанное первое плечо содержит антитело согласно любому из вариантов реализации 126-146.

Согласно варианту реализации 178 предложен биспецифический агент согласно варианту реализации 177, характеризующийся тем, что указанное второе плечо содержит антигенсвязывающий сайт из антитела.

Согласно варианту реализации 179 предложен биспецифический агент по п.177, характеризующийся тем, что указанное второе плечо специфически связывает PD-1, PD-L1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, OX-40 или GITR.

Согласно варианту реализации 180 предложен биспецифический агент по п.177, характеризующийся тем, что указанное второе плечо специфически связывает опухолевый антиген.

Согласно варианту реализации 181 предложен биспецифический агент согласно варианту реализации 177, характеризующийся тем, что указанное второе плечо содержит иммунотерапевтический агент.

Согласно варианту реализации 182 предложен биспецифический агент согласно варианту реализации 181, характеризующийся тем, что указанный иммунотерапевтический агент выбран из группы, состоящей из: гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМКСФ), макрофагального колониестимулирующего фактора (МКСФ), гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (ГКСФ), интерлейкина 2 (ИЛ-2), интерлейкина 3 (ИЛ-3), интерлейкина 12 (ИЛ-12), интерлейкина 15 (ИЛ-15), B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), лиганда 4-1BB, GITRL, OX-40L, антитела против CD3, антитела против CTLA4, антитела против PD-1, антитела против PD-L1, антитела против GITR, антитела против OX-40, антитела против 4-1BB, антитела против LAG-3 и антитела против TIM-3.

Согласно варианту реализации 183 предложен биспецифический агент согласно любому из вариантов реализации 177-182, при этом указанное первое плечо содержит первый CH3-домен, а указанное второе плечо содержит второй CH3-домен, каждый из которых модифицирован таким образом, чтобы стимулировать образование гетеродимеров.

Согласно варианту реализации 184 предложен биспецифический агент согласно варианту реализации 183, характеризующийся тем, что указанные первый и второй CH3-домены модифицированы на основании электростатических эффектов.

Согласно варианту реализации 185 предложен биспецифический агент согласно любому из вариантов реализации 177-182, характеризующийся тем, что указанное первое плечо содержит первую константную область IgG1 человека с заменами аминокислот в положениях, соответствующих положениям 253 и 292 последовательности SEQ ID NO: 41, при этом указанные аминокислоты заменены на глутамат или аспартат, а указанное второе плечо содержит вторую константную область IgG1 человека с заменами аминокислот в положениях, соответствующих положениям 240 и 282 последовательности SEQ ID NO: 41, при этом указанные аминокислоты заменены на лизин.

Согласно варианту реализации 186 предложен биспецифический агент согласно любому из вариантов реализации 177-182, характеризующийся тем, что указанное первое плечо содержит первую константную область IgG1 человека с заменами аминокислот в положениях, соответствующих положениям 240 и 282 последовательности SEQ ID NO: 41, при этом указанные аминокислоты заменены на лизин, а указанное второе плечо содержит вторую константную область IgG1 человека с заменами аминокислот в положениях, соответствующих положениям 253 и 292 последовательности SEQ ID NO: 41, при этом указанные аминокислоты заменены на глутамат или аспартат.

Согласно варианту реализации 187 предложен биспецифический агент согласно варианту реализации 183, характеризующийся тем, что указанные первый и второй CH3-домены модифицированы с применением принципа "выступы-во-впадины".

Согласно варианту реализации 188 биспецифический агент согласно любому из вариантов реализации 177-187 ингибирует связывание TIGIT с PVR.

Согласно варианту реализации 189 биспецифический агент согласно любому из вариантов реализации 177-187 ингибирует или блокирует взаимодействие между TIGIT и PVR.

Согласно варианту реализации 190 биспецифический агент согласно любому из вариантов реализации 177-187 ингибирует сигнализацию TIGIT.

Согласно варианту реализации 191 биспецифический агент согласно любому из вариантов реализации 177-187 представляет собой антагонист опосредованной TIGIT сигнализации.

Согласно варианту реализации 192 биспецифический агент согласно любому из вариантов реализации 177-187 ингибирует активацию TIGIT.

Согласно варианту реализации 193 биспецифический агент согласно любому из вариантов реализации 177-187 ингибирует фосфорилирование TIGIT.

Согласно варианту реализации 194 биспецифический агент согласно любому из вариантов реализации 177-187 снижает экспрессию TIGIT на поверхности клеток.

Согласно варианту реализации 195 биспецифический агент согласно любому из вариантов реализации 177-187 индуцирует и/или усиливает иммунный ответ.

Согласно варианту реализации 196 предложен биспецифический агент согласно варианту реализации 195, характеризующийся тем, что указанный иммунный ответ направлен на опухоль или опухолевую клетку.

Согласно варианту реализации 197 биспецифический агент согласно любому из вариантов реализации 177-187 повышает клеточный иммунитет.

Согласно варианту реализации 198 биспецифический агент согласно любому из вариантов реализации 177-187 повышает Т-клеточную активность.

Согласно варианту реализации 199 биспецифический агент согласно любому из вариантов реализации 177-187 повышает CTL-активность.

Согласно варианту реализации 200 биспецифический агент согласно любому из вариантов реализации 177-187 повышает активность NK-клеток.

Согласно варианту реализации 201 биспецифический агент согласно любому из вариантов реализа-

ции 177-187 увеличивает продуцирование ИЛ-2 и/или число продуцирующих ИЛ-2 клеток.

Согласно варианту реализации 202 биспецифический агент согласно любому из вариантов реализации 177-187 увеличивает продуцирование ИФН-γ и/или число продуцирующих ИФН-γ клеток.

Согласно варианту реализации 203 биспецифический агент согласно любому из вариантов реализации 177-187 повышает иммунный ответ Th1-типа.

Согласно варианту реализации 204 биспецифический агент согласно любому из вариантов реализации 177-187 уменьшает продуцирование ИЛ-4 и/или число продуцирующих ИЛ-4 клеток.

Согласно варианту реализации 205 биспецифический агент согласно любому из вариантов реализации 177-187 уменьшает продуцирование ИЛ-10 и/или число продуцирующих ИЛ-10 клеток.

Согласно варианту реализации 206 биспецифический агент согласно любому из вариантов реализации 177-187 снижает иммунный ответ Th2-типа.

Согласно варианту реализации 207 биспецифический агент согласно любому из вариантов реализации 177-187 ингибирует и/или снижает супрессорную активность клеток Treg.

Согласно варианту реализации 208 биспецифический агент согласно любому из вариантов реализации 177-187 ингибирует и/или снижает супрессорную активность клеток СКМП.

Согласно варианту реализации 209 биспецифический агент согласно любому из вариантов реализации 177-208 ингибирует рост опухоли.

Согласно варианту реализации 210 предложен полипептид, содержащий последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 82 и SEQ ID NO: 83.

Согласно варианту реализации 211 предложена клетка, содержащая или продуцирующая антитело, биспецифический агент или полипептид согласно любому из вариантов реализации 126-210.

Согласно варианту реализации 212 предложена композиция, содержащая антитело, биспецифический агент или полипептид согласно любому из вариантов реализации 126-210.

Согласно варианту реализации 213 предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело, биспецифический агент или полипептид согласно любому из вариантов реализации 126-210, и фармацевтически приемлемый носитель.

Согласно варианту реализации 214 предложена выделенная молекула полинуклеотида, содержащая полинуклеотид, который кодирует антитело, биспецифический агент или полипептид согласно любому из вариантов реализации 126-210.

Согласно варианту реализации 215 предложен выделенный полинуклеотид, содержащий последовательность полинуклеотидов, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76 и SEQ ID NO: 84.

Согласно варианту реализации 216 предложен вектор, содержащий полинуклеотид согласно варианту реализации 214 или варианту реализации 215.

Согласно варианту реализации 217 предложена выделенная клетка, содержащая полинуклеотид согласно варианту реализации 214 или варианту реализации 215.

Согласно варианту реализации 218 предложена выделенная клетка, содержащая вектор согласно варианту реализации 216.

Согласно варианту реализации 219 предложен способ индукции иммунного ответа, активации иммунного ответа, стимуляции иммунного ответа, повышения, усиления или увеличения продолжительности иммунного ответа у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества антитела, биспецифического агента или полипептида согласно любому из вариантов реализации 126-210.

Согласно варианту реализации 220, способ индукции иммунного ответа, активации иммунного ответа, стимуляции иммунного ответа, повышения, усиления или увеличения продолжительности иммунного ответа у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества антитела согласно любому из вариантов реализации 126-153.

Согласно варианту реализации 221 предложен способ согласно варианту реализации 219 или варианту реализации 220, характеризующийся тем, что указанный иммунный ответ направлен против опухоли или рака.

Согласно варианту реализации 222 предложен способ ингибирования роста опухолевых клеток, характеризующийся тем, что указанный способ включает приведение указанных опухолевых клеток в контакт с эффективным количеством антитела, биспецифического агента или полипептида согласно любому из вариантов реализации 126-210.

Согласно варианту реализации 223 предложен способ ингибирования роста опухоли у субъекта, характеризующийся тем, что указанный способ включает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества антитела, биспецифического агента или полипептида согласно любому из вариантов реализации 126-210.

Согласно варианту реализации 224 предложен способ ингибирования роста опухоли у субъекта, характеризующийся тем, что указанный способ включает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества антитела согласно любому из вариантов реализации 126-153.

Согласно варианту реализации 225 предложен способ согласно любому из вариантов реализации

221-224, характеризующийся тем, что указанная опухоль или опухолевая клетка выбрана из группы, состоящей из опухоли ободочной и прямой кишки, опухоли яичника, опухоли поджелудочной железы, опухоли легкого, опухоли печени, опухоли молочной железы, опухоли почки, опухоли предстательной железы, опухоли желудочно-кишечного тракта, меланомы, опухоли шейки матки, опухоли мочевого пузыря, глиобластомы и опухоли головы и шеи.

Согласно варианту реализации 226 предложен способ лечения рака у субъекта, характеризующийся тем, что указанный способ включает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества антитела, биспецифического агента или полипептида согласно любому из вариантов реализации 126-210.

Согласно варианту реализации 227 предложен способ лечения рака у субъекта, характеризующийся тем, что указанный способ включает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества антитела согласно любому из вариантов реализации 126-153.

Согласно варианту реализации 228 предложен способ согласно варианту реализации 226 или варианту реализации 227, характеризующийся тем, что указанный рак выбран из группы, состоящей из рака ободочной и прямой кишки, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака легкого, рака печени, рака молочной железы, рака почки, рака предстательной железы, рака желудочно-кишечного тракта, меланомы, рака шейки матки, рака мочевого пузыря, глиобластомы и рака головы и шеи.

Согласно варианту реализации 229 способ согласно любому из вариантов реализации 219-228 дополнительно включает введение по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента.

Согласно варианту реализации 230 предложен способ согласно варианту реализации 229, характеризующийся тем, что указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент.

Согласно варианту реализации 231 предложен способ согласно варианту реализации 229, характеризующийся тем, что указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой антитело.

Согласно варианту реализации 232 предложен способ согласно варианту реализации 229, характеризующийся тем, что указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой иммунотерапевтический агент.

Согласно варианту реализации 233 предложен способ согласно варианту реализации 232, характеризующийся тем, что указанный иммунотерапевтический агент выбран из группы, состоящей из: ГМКСФ, МКСФ, ГКСФ, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-12, ИЛ-15, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), лиганда 4-1BB, GITRL, лиганда OX-40, антитела против CD3, антитела против CTLA-4, антитела против PD-1, антитела против PD-L1, антитела против GITR, антитела против OX-40, антитела против 4-1BB, антитела против LAG-3 и антитела против TIM-3.

Согласно варианту реализации 234 предложен способ согласно варианту реализации 229, характеризующийся тем, что указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой ингибитор пути Notch, пути Wnt или пути RSPO/LGR.

Согласно варианту реализации 235 предложен способ согласно любому из вариантов реализации 219-221 или 223-234, характеризующийся тем, что у указанного субъекта была удалена опухоль или рак.

Согласно варианту реализации 236 предложен способ согласно любому из вариантов реализации 221-235, характеризующийся тем, что указанная опухоль или указанный рак экспрессирует PD-L1.

Согласно варианту реализации 237 предложен способ согласно любому из вариантов реализации 221-236, дополнительно включающий этап определения уровня экспрессии PD-L1 в указанной опухоли или указанном раке.

Согласно варианту реализации 238 предложен способ согласно варианту реализации 237, характеризующийся тем, что определение уровня экспрессии PD-L1 выполняют до лечения или контакта с антителом.

Согласно варианту реализации 239 предложен способ согласно варианту реализации 236 или варианту реализации 237, характеризующийся тем, что в том случае, если указанная опухоль или указанный рак характеризуется повышенным уровнем экспрессии PD-L1, указанное антитело, указанный биспецифический агент или полипептид: (a) вводят указанному субъекту; или (b) приводят в контакт с указанной опухолью или опухолевой клеткой.

Согласно варианту реализации 240 предложена плазмида, депонированная в ATCC, которой присвоен номер PTA-122346.

Согласно варианту реализации 241 предложена плазмида, депонированная в ATCC, которой присвоен номер PTA-122347.

Согласно варианту реализации 242 предложено антитело, содержащее последовательность аминокислот тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 82, и последовательность аминокислот легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 72.

VI. Скрининг.

В настоящем изобретении предложены способы скрининга для идентификации связывающих TIGIT агентов, которые модулируют иммунный ответ. Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем изобретении предложены способы скрининга кандидатных агентов, в том числе, но не ограничиваясь

перечисленными, полипептидов, антител, пептидов, пептидомиметиков, малых молекул, соединений или других лекарственных средств, которые модулируют иммунный ответ.

Согласно некоторым вариантам реализации способ скрининга для определения кандидатного связывающего TIGIT агента, который модулирует иммунный ответ, включает определение того, оказывает ли указанный агент эффект на иммунные клетки. Согласно некоторым вариантам реализации способ скрининга для определения кандидатного связывающего TIGIT агента, который модулирует иммунный ответ, включает определение того, способен ли указанный агент повышать активность иммунных клеток. Согласно некоторым вариантам реализации способ скрининга для определения кандидатного связывающего TIGIT агента, который модулирует иммунный ответ, включает определение того, способен ли указанный агент повышать активность цитолитических клеток, таких как CTL и/или NK-клетки. Согласно некоторым вариантам реализации способ скрининга для определения кандидатного связывающего TIGIT агента, который модулирует иммунный ответ, включает определение того, способен ли указанный агент снижать активность иммуносупрессорных клеток, таких как Treg, или клеток СКМП.

VII. Наборы, содержащие агенты, описанные в настоящем документе.

В настоящем изобретении предложены наборы, которые содержат связывающие TIGIT агенты, описанные в настоящем документе, и могут применяться для реализации способов, описанных в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации набор содержит по меньшей мере один очищенный связывающий TIGIT агент в одном или более контейнерах. Согласно некоторым вариантам реализации указанные наборы содержат все компоненты, необходимые и/или достаточные для проведения детекционного анализа, в том числе все контроли, указания для проведения анализов, и все необходимое программное обеспечение для анализа и представления результатов. Специалисту в данной области техники будет ясно, что раскрытые связывающие TIGIT агенты согласно настоящему изобретению могут быть легко включены в наборы одного из общеизвестных форматов, хорошо известных в данной области техники.

Дополнительно предложены наборы, которые содержат связывающий TIGIT агент, а также по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент. Согласно некоторым вариантам реализации указанный второй (или более) терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент. Согласно некоторым вариантам реализации указанный второй (или более) терапевтический агент представляет собой антитело.

Варианты реализации настоящего изобретения могут быть дополнительно определены посредством ссылки на приведенные ниже неограничивающие примеры, в которых подробно описано получение определенных антител согласно настоящему изобретению и способов применения антител согласно настоящему изобретению. Специалистам в данной области техники будет понятно, что могут быть осуществлены многие модификации как материалов, так и способов без отступления от объема настоящего изобретения.

Примеры

Пример 1. Получение антител против TIGIT.

Антитела против TIGIT получали с применением внеклеточного домена TIGIT мыши для иммунизации кроликов. С применением проточной цитометрии проводили скрининг супернатантов на наличие связывания антитела с TIGIT мыши и TIGIT человека, и отбирали 9 клонов антител для дополнительной характеризации (фиг. 1). Проводили скрининг супернатантов от указанных антител на способность специфически блокировать взаимодействие TIGIT мыши с соответствующим контррецептором, PVR мыши. Для четырех антител было продемонстрировано блокирование взаимодействия TIGIT/PVR. Важно, что два из указанных антител были способны связывать TIGIT человека (313RM и 313Rb2).

Вариабельные области тяжелых цепей и легких цепей 313Rb1 клонировали в Ig формата IgG1 мыши для получения химерного антитела 313R11 и формата IgG2a мыши для получения химерного антитела 313R12. Последовательности из участков CDR 313R11 и 313R12 представлены: (i) CDR1 тяжелой цепи GSSLSSSYMS (SEQ ID NO: 7), (ii) CDR2 тяжелой цепи IIGSNGNTYYANWAKG (SEQ ID NO: 8), (in) CDR3 тяжелой цепи GGYRTSGMDP (SEQ ID NO: 9), (iv) CDR1 легкой цепи QASQSISSYLNW (SEQ ID NO: 10), (v) CDR2 легкой цепи DALKLAS (SEQ ID NO: 11) и (vi) CDR3 легкой цепи QQEHSVGNVDN (SEQ ID NO: 12). Последовательность вариабельной области тяжелой цепи 313R11 и 313R12 представлена последовательностью SEQ ID NO: 17, а последовательность вариабельной области легкой цепи 313R11 и 313R12 представлена последовательностью SEQ ID NO: 18. Последовательность тяжелой цепи 313R11 представлена последовательностью SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 26 (без сигнальной последовательности). Последовательность тяжелой цепи 313R12 представлена последовательностью SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 27 (без сигнальной последовательности). Последовательность легкой цепи 313R11 и 313R12 представлена последовательностью SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 28 (без сигнальной последовательности).

Вариабельные области тяжелой цепи и легкой цепи 313Rb2 клонировали в Ig формата IgG1 человека для получения антитела 313R14. Участки CDR модифицировали для увеличения аффинности TIGIT человека, и каркасные области оптимизировали и/или гуманизировали с получением нескольких вариантов, в том числе 313R19. Последовательности из участков CDR 313R14 и 313R19 представлены: (i) CDR1

тяжелой цепи GFSLSSSYMS (SEQ ID NO: 13), (ii) CDR2 тяжелой цепи IIGSNGNTYYANWAKG (SEQ ID NO: 8), (iii) CDR3 тяжелой цепи GGYRTSGMDP (SEQ ID NO: 9), (iv) CDR1 легкой цепи QASQSNIYSDLAW (SEQ ID NO: 14) или QASQNIYSDLAW (SEQ ID NO: 81), (v) CDR2 легкой цепи RASTLAS (SEQ ID NO: 15) и (vi) CDR3 легкой цепи QQEHLVAWIYN (SEQ ID NO: 16). Последовательность вариабельной области тяжелой цепи 313R14 представлена последовательностью SEQ ID NO: 19, а последовательность вариабельной области легкой цепи 313R14 представлена последовательностью SEQ ID NO: 20. Последовательность вариабельной области тяжелой цепи 313R19 представлена последовательностью SEQ ID NO: 32, а последовательность вариабельной области легкой цепи 313R19 представлена последовательностью SEQ ID NO: 20. Последовательность тяжелой цепи 313R14 представлена последовательностью SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 29 (без сигнальной последовательности). Последовательность тяжелой цепи 313R19 представлена последовательностью SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 34 (без сигнальной последовательности).

Последовательность легкой цепи 313R14 и 313R19 представлена последовательностью SEQ ID NO: 25 или SEQ ID NO: 30 (без сигнальной последовательности).

Плазмида, кодирующая полипептид, содержащий вариабельную область тяжелой цепи антитела 313R19, была депонирована в Американской коллекции типовых культур (ATCC), 10801 University Boulevard, Манассас, Виргиния, США, согласно условиям Будапештского договора от 27 мая 2015 г., и обозначается PTA-122180. Плазмида, кодирующая полипептид, содержащий вариабельную область легкой цепи антитела 313R19, была депонирована в базе ATCC, 10801 University Boulevard, Манассас, Виргиния, США, согласно условиям Будапештского договора от 27 мая 2015 г., и обозначается PTA-122181.

Пример 2. Сигнализация TIGIT и фосфорилирование TIGIT.

Согласно описанию в настоящем документе, после взаимодействия TIGIT с его контррецептором PVR происходит фосфорилирование TIGIT по цитоплазматическому "хвосту". Фосфорилирование TIGIT представляет собой начало каскада, который включает нижестоящие события, влияющие на другие известные сигнальные пути. Соответственно, оценка фосфорилирования TIGIT, а также статуса фосфорилирования нисходящих белков может обеспечивать информацию функции TIGIT и эффекте антагониста TIGIT.

В клетках линии Т-клеток человека Jurkat CD4+ отсутствует экспрессия TIGIT человека или мыши по оценке с применением ПЦР в реальном времени и FACS (данные не показаны). Для получения экспрессирующей TIGIT линии клеток клетки Jurkat инфицировали лентивирусной конструкцией, экспрессирующей TIGIT мыши (mTIGIT), меченый FLAG и зеленым флуоресцентным белком (GFP). В клетках линии клеток лимфомы мыши E.G7-OVA отсутствует экспрессия PVR человека или мыши по оценке с применением ПЦР в реальном времени и/или FACS. Клетки E.G7-OVA конститутивно синтезируют и секретируют овальбумин (OVA), и у мышей C57BL/6, иммунизированных клетками E.G7-OVA, образуются H-2 K^b-рестриктированные цитотоксические лимфоциты, специфические для пептида OVA 258-276. Для получения экспрессирующей PVR линии клеток клетки E.G7-OVA инфицировали лентивирусной конструкцией, экспрессирующей PVR мыши (mPVR) и GFP. Положительные по GFP клетки из каждой инфицированной линии клеток были отсортированы в 96-луночные планшеты с применением инструмента FACSAria II (BD Biosciences), и выделенные одиночные клетки размножали с получением клонов. Положительный результат для GFP и экспрессию mTIGIT или mPVR подтверждали в указанных полученных из единственной клетки клонах путем FACS-анализа и ПЦР в реальном времени (данные не показаны).

Для оценки фосфорилирования TIGIT в ответ на PVR линии клеток инкубировали в не содержащих сыворотки средах в течение 2 ч при 37°C. Клетки Jurkat-mTIGIT смешивали с исходными клетки E.G7-OVA или клетки E.G7-OVA-mPVR с соотношением клеток, составляющим 5:1, и инкубировали в течение 5 мин при 37°C в присутствии ингибитора тирозинфосфатазы (10 мМ ортованадат натрия, New England Biolabs). Получали клеточные лизаты и иммунопреципитировали с покрытыми антителом против FLAG магнитными гранулами, которые захватывали меченые FLAG белки mTIGIT. Иммунопреципитаты оценивали с применением анализа методом вестерн-блоттинга. Присутствие фосфорилированного TIGIT оценивали с применением антифосфотирозинового антитела (Cell Signaling Technology). Присутствие тотального TIGIT оценивали с применением антитела против FLAG (Cell Signaling Technology).

В Т-клетках наблюдалось сильно выраженное фосфорилирование TIGIT в ответ на экспрессирующие mPVR опухолевые клетки по сравнению с фосфорилированием в ответ на клетки, не экспрессирующие PVR (фиг. 2A).

Для оценки других сигнальных путей, на которые потенциально влияет TIGIT, линии клеток инкубировали в не содержащих сыворотки средах в течение 2 ч при 37°C. Клетки Jurkat-mTIGIT комбинировали с исходными клетками E.G7-OVA или клетками E.G7-OVA-mPVR при соотношении клеток 5:1 и инкубировали при 37°C в течение 0, 5, 15, 45 или 60 мин. Получали клеточные лизаты и оценивали путем анализа методом вестерн-блоттинга. Уровни фосфорилированной SHP1 (содержащей SH2 тирозинфосфатазы 1) и Erk1/2 определяли с применением антитела против фосфо-SHP1 (Tyr564) и антитела против фосфо-Erk1/2 (Thr202/Tyr204), соответственно (оба антитела от Cell Signaling Technology). Уровень тотальной Erk1/2 оценивали с применением антитела против Erk1/2 (Cell Signaling Technology). SHP1 пред-

ставляет собой важный негативный регулятор путей цитокин-опосредованной передачи сигналов, в том числе пути JAK/STAT, тогда как Erk1/2 представляют собой протеинкиназы, принимающие участие в каскаде передачи сигналов Ras-Raf-MEK-ERK.

Как показано на фиг. 2B, специфическая активация SHP1 и Erk1/2 происходила при инкубации экспрессирующих TIGIT Т-клеток с экспрессирующими mPVR опухолевыми клетками. Исходя из фосфорилирования, активация наблюдалась уже через 5 мин и, согласно наблюдениям, начинала уменьшаться через 45 мин в случае Erk1/2 и через 60 мин в случае SHP1. Активация SHP1 и Erk1/2 не происходила в ответ на mPVR в исходных Т-клетках Jurkat, не экспрессирующих mTIGIT (данные не показаны).

Для исследования того, ингибируют ли антагонисты TIGIT активность TIGIT, проводили анализ фосфорилирования TIGIT в присутствии антител против TIGIT. Согласно описанию выше, клетки Jurkat-mTIGIT смешивали с исходными клетками E.G7-OVA или клетками E.G7-OVA-mPVR с соотношением клеток, составляющим 5:1, и инкубировали в течение 5 мин при 37°C в присутствии 10 мМ ортованадата натрия и 20 мкг/мл контрольного антитела (поликлональный IgG мыши; Sigma), антителом против TIGIT 313R11, антителом против TIGIT 313R12 или антителом против TIGIT 313Rb1. Получали клеточные лизаты и иммунопреципитировали с покрытыми антителом против FLAG магнитными гранулами, которые захватывали меченые FLAG белки mTIGIT. Иммунопреципитаты оценивали с применением анализа методом вестерн-блоттинга. Присутствие фосфорилированного TIGIT оценивали с применением антифосфотирозинового антитела. Присутствие тотального TIGIT оценивали с применением антитела против FLAG.

Как ранее было показано, сильно выраженное фосфорилирование mTIGIT происходило тогда, когда экспрессирующие mTIGIT Т-клетки Jurkat комбинировали с экспрессирующими mPVR опухолевыми клетками. Фосфорилирование mTIGIT в ответ на взаимодействие с mPVR снижалось и/или подавлялось тогда, когда клетки инкубировали в присутствии антител против TIGIT. Указанное уменьшение фосфорилирования TIGIT было наиболее ярко выражено в случае антитела против TIGIT 313R12 (фиг. 3).

Были проведены дополнительные эксперименты для исследования того, ингибируют ли антагонисты TIGIT сигнализацию TIGIT. Аналогично описанным в настоящем документе исследованиям клетки Jurkat-mTIGIT смешивали с исходными клетками E.G7-OVA или клетками E.G7-OVA-mPVR с соотношением клеток, составляющим 5:1, и инкубировали в течение 15 мин при 37°C в присутствии увеличения концентраций (0-40 мкг/мл) антитела против TIGIT 313R11, антитела против TIGIT 313R12 или антитела против TIGIT 313Rb1. Получали клеточные лизаты и оценивали путем анализа методом вестерн-блоттинга. Фосфорилированную SHP1 (содержащая SH2 тирозинфосфатаза 1) и фосфорилированную Erk1/2 определяли с применением антитела против фосфо-SHP1 (Tyr562) и антитела против фосфо-Erk1/2 (Thr202/Tyr204), соответственно. Уровень тотальной SHP1 оценивали с применением антитела против SHP1. Уровень тотальной Erk1/2 оценивали с применением антитела против Erk1/2.

Фосфорилирование Erk1/2 в ответ на взаимодействие mTIGIT-mPVR явным дозозависимым образом ингибировало антитела против TIGIT (фиг. 4). Фосфорилирование SHP1 в ответ на взаимодействие mTIGIT-mPVR дозозависимым образом ингибировало антитело против TIGIT 313Rb1 и 313#11. В продемонстрированном эксперименте, как было показано, антитело 313R12 оказывало только слабый эффект на фосфорилирование SHP1.

Указанные результаты дают веские основания предполагать, что антитела против TIGIT ингибируют функцию TIGIT и влияют на нижестоящие сигнальные пути.

Пример 3. Опосредованное TIGIT ингибирование продуцирования цитокинов.

Т-клеточная гибридома B3Z86/90.14 (B3Z) стабильно экспрессирует OVA-специфический H-2K^b Т-клеточный рецептор (TCR). Клетки B3Z инфицировали лентивирусной конструкцией, экспрессирующей TIGIT мыши (mTIGIT), и получали из единственной клетки клон mTIGIT (B3Z-mTIGIT). Клетки E.G7-OVA линии клеток лимфомы мыши стабильно экспрессирует OVA и может активировать OVA-специфический TCR на клетках B3Z, что приводит к секреции ИЛ-2. Для определения эффекта взаимодействий mTIGIT/mPVR на антиген-специфическую секрецию ИЛ-2 исходные клетки B3Z или клетки B3Z-mTIGIT инкубировали с исходными клетками E.G7-OVA или клетками E.G7-OVA-mPVR (описанными выше, см. пример 2) в соотношении 2:1 в 12-луночных планшетах. Через 24 ч измеряли концентрации ИЛ-2 в бесклеточных культуральных супернатантах с применением ИФА ELISA (R&D Systems). Данные выражают в виде отношения секреции ИЛ-2 исходными клетками B3Z или Т-клетками B3Z-mTIGIT в ответ на экспрессирующие mPVR опухолевые клетки и секреции ИЛ-2 в ответ на отрицательные по mPVR опухолевые клетки.

В случае исходных Т-клеток B3Z секреция ИЛ-2 была аналогичной независимо от экспрессии mPVR на OVA-презентирующих опухолевых клетках (т.е. отношение, составляющее приблизительно 1,0). И напротив, секреция ИЛ-2 Т-клетками B3Z-mTIGIT была ниже в присутствии экспрессирующих mPVR опухолевых клеток, чем в присутствии отрицательных по mPVR опухолевых клеток (т.е. отношение < 1,0) (фиг. 5A). При предварительной обработке Т-клеток B3Z-mTIGIT 20 мкг/мл антитела против TIGIT 313R11 или 313R12 до совместного культивирования с клетками E.G7-OVA, ингибирование продуцирования ИЛ-2 уже не происходило (фиг. 5B).

Указанные результаты предполагают, что активация mTIGIT посредством mPVR ингибирует акти-

вацию Т-клеток в ответ на антиген, о чем свидетельствует уменьшение продуцирования ИЛ-2. Кроме того, блокада TIGIT антагонистом TIGIT ингибирует активацию TIGIT и, по-видимому, снижает TIGIT-ассоциированное ингибирование Т-клеточной активности, на что указывает выраженное продуцирование ИЛ-2. Указанные данные подтверждают теорию, что ингибирование TIGIT может "растормаживать" Т-клеточную супрессию и усиливают иммунный ответ.

Пример 4. Опосредованное TIGIT ингибирование цитотоксичности NK-клеток.

Клетки линии естественных киллеров (NK) человека NK-92 инфицировали лентивирусной конструкцией, экспрессирующей mTIGIT, меченый FLAG, и GFP, и получали клональную линию клеток (NK-92-mTIGIT) согласно описанию выше. Клетки линии В-клеток человека 721.221 инфицировали лентивирусной конструкцией, экспрессирующей mPVR и GFP, и получали клональную линию клеток (721.221-mPVR). Отсутствие экспрессии человека или мыши PVR исходными клетками 721.221 подтверждали посредством FACS и ПЦР в реальном времени (данные не показаны). Способность исходных клеток NK-92 или клеток NK-92-mTIGIT лизировать исходные опухолевые клетки 721.221 или клетки 721.221-mPVR тестировали в ходе стандартного 4-часового анализа на высвобождение кальцеина. Клетки NK-92 или NK-92-mTIGIT высевали в 96-луночные планшеты с V-образным дном. Целевые клетки 721.221 или 721-221-mPVR метили 10 мкМ ацетоксиметил-кальцеина (кальцеина AM) (Life Technologies) в течение 1 ч при 37°C, а затем комбинировали с клетками NK-92 с соотношением эффекторных:целевых клеток, составляющим 25:1 или 12:1. После 4-часовой инкубации при 37°C собирали бесклеточные супернатанты и высвобождение кальцеина количественно определяли на флуориметре с длиной волны возбуждения, составляющей 485 нм, и длиной волны излучения, составляющей 535 нм. В последующем эксперименте клетки NK-92 и NK-92-mTIGIT инкубировали в присутствии 20 мкг/мл антитела против TIGIT 313R11, антитела 313R12 или контрольного антитела в течение X минут. Затем указанные клетки используют в анализе на высвобождение кальцеина согласно описанию выше.

Процент специфического лизиса клеток определяют следующим образом: % лизиса=100×(ER-SR)/(MR-SR), где ER, SR и MR соответствуют экспериментальному, спонтанному и максимальному высвобождению кальцеина, соответственно. Спонтанное высвобождение представляет собой флуоресценцию, испускаемую целевыми клетками, инкубированными в средах отдельно (т.е. в отсутствие эффекторных клеток); максимальное высвобождение определяют путем лизиса целевых клеток равным объемом 10% ДСН. Данные представлены в виде отношения цитотоксичности клеток NK-92 (исходных или NK-92-mTIGIT), направленной против целевых клеток 721.221-mPVR, к цитотоксичности клеток NK-92 (исходных или NK-92-mTIGIT), направленной против исходных (отрицательных по mPVR) целевых клеток 721.221.

Как показано на фиг. 6A, цитотоксичность исходных клеток NK-92, направленная против положительных по mPVR и отрицательных по mPVR целевых клеток 721.221 была аналогичной (т.е. отношение составляло приблизительно 1,0). В отличие от этого, цитотоксичность клеток NK-92-mTIGIT, направленная против клеток 721.221-mPVR, была ниже, чем цитотоксичность, направленная против отрицательных по mPVR исходных клеток линии 721.221 (т.е. отношение составляло < 1,0). В тех случаях когда отношение эффекторных клеток к целевым клеткам составляло 25:1 или 12:1, различия в результатах отсутствовали. В тех случаях когда клетки NK-92 или NK-92-mTIGIT обрабатывали антителом против TIGIT 313R11 или антителом 313R12 до использования в анализе цитотоксичности, ингибирование клеточноопосредованной цитотоксичности было снижено и/или подавлено (фиг. 6B).

Указанные результаты предполагают, что активация mTIGIT посредством mPVR ингибирует опосредованную NK-клетками цитотоксичность. Важно отметить, что эти результаты показывают, что антагонист TIGIT может вмешиваться во взаимодействие PVR-TIGIT и приводить к восстановлению или "растормаживать" цитотоксический потенциал NK-клеток.

Пример 5. Ингибирование роста опухоли in vivo антителом против TIGIT.

Клетки линии опухоли ободочной кишки мыши CT26.WT имплантировали подкожно (30000 клеток/мышь) в заднюю боковую область мышам Balb/c возрастом 6-8 недель. Опухолям позволяли расти в течение 10 дней до достижения объема, составляющего приблизительно 50 мм^3. Мыши получали лечение в виде 0,25 мг/мышь антитела против TIGIT 313R11 (антитело mIgG1), антитела против TIGIT 313R12 (антитело mIgG2a), контрольного антитела mIgG1 или контрольного антитела mIgG2a (n=10 на группу контрольных антител и 20 на группу экспериментальных антител). Мышей дозировали путем внутрибрюшинной инъекции дважды в неделю в течение трех недель. Проводили мониторинг роста опухоли и измеряли объемы опухолей электронным калипером на 10, 15, 18, 22, 25 и 29 дни.

Как показано на фиг. 7A, антитело против TIGIT 313R12 ингибировало рост опухоли почти на 75% по сравнению с контрольным антителом совпадающего изотипа. У 9 мышей произошел регресс опухолей до недетектируемых уровней к 29 дню. Антитело против TIGIT 313R11 ингибировало рост опухоли только приблизительно на 15% по сравнению с контрольным антителом совпадающего изотипа. Антитела 313R11 и 313R12 отличаются только по изотипу IgG, так как 313R12 представляет собой антитело IgG2a и 313R11 представляет собой антитело IgG1. Указанные результаты предполагают, что изотип антитела может оказывать значимый эффект на терапевтическую эффективность антител против TIGIT. Антитела IgG2 мыши (эквивалентные антителам IgG1 человека), как известно, отличаются повышенной

АЗКЦ-активностью по сравнению с антителами IgG1 мыши (эквивалентные IgG2 человека) и указанная биологическая характеристика может играть роль в выраженном противоопухолевом эффекте антитела 313R12.

Указанный эксперимент повторяли с антителом против TIGIT 313R12 и контрольным антителом mIgG2a. Согласно описанию выше, клетки CT26.WT имплантировали подкожно (30000 клеток/мышь) в заднюю боковую область мышам Balb/c возрастом 6-8 недель. Опухолям позволяли расти в течение 7 дней до достижения объема, составляющего приблизительно 55 мм^3. Мыши получали лечение в виде 0,25 мг/мышь антитела против TIGIT 313R12 или контрольного антитела mIgG2a (n=10 на группу). Мышей дозировали путем внутрибрюшинной инъекции дважды в неделю в течение 3 недель. Проводили мониторинг роста опухоли и измеряли объемы опухолей электронным калипером на дни 7, 14, 17, 21, 25, 28 и 31.

Аналогично наблюдениям в предыдущем исследовании, антитело против TIGIT 313R12 ингибировало рост опухолей CT26.WT; ингибирование роста опухоли наблюдалось у всех 10 мышей (фиг. 7B). Кроме того, у 9 из 10 мышей, получавших лечение антителом 313R12, произошел регресс опухолей с уменьшением начального размера, при этом 8 опухолей регрессировали до недетектируемых уровней через 2 недели лечения. В настоящем исследовании произошел регресс трех опухолей в контрольной группе, получавшей антитело IgG2, однако известно, что регресс опухоли может происходить у не получающих лечения иммунокомпетентных мышей, в частности, при незначительном стартовом количестве опухолевых клеток. Однако полное ингибирование роста и/или регресс опухолей в получавшей лечение антителом 313R12 группе продемонстрировало, что лечение антителом против TIGIT оказывает значимый терапевтический эффект, который может быть обусловлен модуляцией и/или усилением иммунного ответа субъекта.

Успешная противораковая иммунотерапия включает формирование долгосрочного противоопухолевого иммунитета. Для исследования развития долгосрочного иммунитета свежими опухолевыми клетками CT26.WT стимулировали мышей из исследований, описанных в настоящем документе, у которых опухоли CT26.WT регрессировали до недетектируемых уровней после лечения антителом против TIGIT. 11 мышам, у которых наблюдался полный регресс опухоли, инъецировали повышенное число клеток CT26.WT (60000 клеток/мышь) на 132 день (через 102 дня после введения последней дозы антитела против TIGIT 313R12). В качестве контроля использовали 10 нестимулированных ранее мышей, которым инъецировали клетки CT26.WT в том же количестве. Лечение мышей не проводилось; проводили мониторинг роста опухоли и измеряли объемы опухолей электронным калипером.

В контрольной группе у всех 10 мышей развивались большие опухоли к 23 дню, и их умерщвляли. И напротив, у 10 мышей, у которых ранее произошло отторжение опухолей CT26.WT, рост опухолей не наблюдался. У остальных мышей наблюдался незначительный рост опухолей через 14 дней после инъекции, однако опухоль полностью регрессировала к 21 дню. Указанных 11 мышей затем повторно стимулировали введением 150000 клеток CT26.WT (5-кратное относительно первой дозы количество клеток). В этом случае также в качестве контроля использовали 10 нестимулированных ранее мышей, которым инъецировали клетки CT26.WT в том же количестве (150000 клеток/мышь). Как и в предыдущем эксперименте, у всех 10 мышей в контрольной группе развивались большие опухоли, и на 22 день их умерщвляли. У 6 мышей опухоли не развивались, еще у 2 мышей развивались небольшие опухоли, полностью регрессировавшие к 22 дню. Еще у 3 мышей наблюдались опухоли незначительного размера, которые, по-видимому, регрессировали или были стабилизированы. Указанные результаты обобщены в табл. 3 и представлены как процент мышей без опухолей в каждой группе.

Таблица 3

	Первая стимуляция 30 000 клеток	1-ая повторная стимуляция 60 000 клеток	2-ая повторная стимуляция 150 000 клеток
Контрольные мыши	10% (1/10)	0% (0/10)	0% (0/10)
Мыши, получавшие лечение антителом 313R12 [1]	55% (11/20)	100% (11/11)	72% (8/11)

[1] Мыши, получавшие лечение антителом 313R12 только после первой опухолевой стимуляции.

Указанные результаты показывают, что лечение антителом против TIGIT может обеспечивать выраженный и эффективный противоопухолевый ответ. Важно отметить, что указанный противоопухолевый ответ, по-видимому, приводит к формированию долгосрочного иммунитета и защиты против опухолевых клеток.

Пример 6. Эффекторная активность антитела IgG2 против TIGIT.

Было показано, что гликозилирование Fc-области IgG имеет существенное значение для оптимального проявления биологической активности, опосредованной FcγRI, FcγII, FcγRIII и компонентом комплемента C1q (т.е. АЗКЦ и КЗЦ). Например, сайт гликозилирования тяжелой цепи антитела IgG2a мыши

расположен в положении остатка аспарагина 314 последовательности SEQ ID NO: 22. Замена указанного остатка аспарагина остатком аланина приводит к дегликозилированию антитела и снижению АЗКЦ-активности. Был получен дегликозилированный вариант антитела против TIGIT 313R12, содержащий остаток аланина в положении 314, и назван 313R13.

Активность антитела против TIGIT 313R13 сравнивали с активностью антитела против TIGIT 313R12 для исследования эффекта дегликозилирования на противоопухолевую активность. Клетки CT26.WT имплантировали (30000 клеток/мышь) в заднюю боковую область мышам Balb/c возрастом 6-8 недель. Опухолям позволяли расти в течение 10 дней до достижения объема, составляющего приблизительно 50 мм^3. Мыши получали лечение в виде 0,25 мг/мышь антитела против TIGIT 313R12, антитела против TIGIT 313R13 или контрольного антитела mIgG2a (n=10 на группу контрольного антитела и 20 на группу экспериментальных антител). Мышей дозировали путем внутрибрюшинной инъекции дважды в неделю в течение трех недель. Проводили мониторинг роста опухоли и измеряли объемы опухолей электронным калипером на 7, 10, 14, 17 и 21 дни.

Как показано на фиг. 8, антитело против TIGIT 313R12 демонстрировало значимое ингибирование роста опухоли по сравнению с контролем совпадающего изотипа. И напротив, дегликозилированное антитело против TIGIT 313R13 не демонстрировало значимой противоопухолевой активности.

Поскольку предполагается, что дегликозилированное антитело не обладает АЗКЦ-активностью или обладает ограниченной АЗКЦ-активностью, указанные результаты предполагают, что АЗКЦ может играть важную роль в выраженной противоопухолевой активности антитела против TIGIT 313R12.

Пример 7. Анализы ELISpot на ИФН-γ, ИЛ-2, ИЛ-4 и ИЛ-10.

ELISpot представляет собой высокочувствительный иммунологический анализ для детекции секретирующих цитокины клеток. Вкратце, в анализе ELISpot задействовано захватывающее антитело, специфическое для требуемого цитокина, предварительно нанесенное на лунки микропланшета. Стимулированные клетки распределяют в лунки, и иммобилизированное антитело, расположенное в непосредственной близости от любой секретирующей цитокины клетки, связывает секретированный цитокин. Затем осуществляют стандартные этапы промывания и инкубирования с подходящими реагентами для детекции. Например, широко используют комбинацию биотинилированного антитела для детекции с последующим добавлением стрептавидина, конъюгированного с щелочной фосфатазой, и окрашенного раствора субстрата. В сайтах локализации цитокинов образуется окрашенный осадок, который выглядит как пятно (спот), при этом каждый индивидуальный спот соответствует индивидуальной секретирующей цитокины клетке. Подсчет слотов может осуществляться с применением автоматизированной системы считывания или вручную с применением микроскопа. Согласно некоторым вариантам реализации осуществляют захват изображений каждой лунки с применением автоматизированной системы считывания, и используют общее число слотов, площадь слотов или общую оптическую плотность (TOD) для количественного определения.

Секретирующие ИФН-γ клетки детектировали с применением набора ELISpot для ИФН-γ мыши (MabTech). Клетки выделяли из селезенок мышей-носителей опухолей CT26.WT, получавших лечение антителом против TIGIT 313R12 (n=6) или контрольным антителом совпадающего изотипа (n=6) (см. пример 5). Спленоциты (5×10^5/лунку) от каждой мыши в каждой экспериментальной группе распределяли в 96-луночный планшет, покрытый антителом, специфическим для ИФН-γ мыши. Указанные клетки культивировали в присутствии или в отсутствие опухолеспецифического CD8+ Т-клеточного пептида AH-1 и инкубировали в течение 48 ч. Пептид AH-1 (SPSYVYHQF; SEQ ID NO: 31) представляет собой H2-L^d-рестриктированный эпитоп белка оболочки gp70 экотропного провируса лейкоза мышей, эндогенного для линии клеток CT26.WT. Клетки, секретирующие ИФН-γ, детектировали в соответствии с инструкциями производителя. Осуществляли захват изображений с применением инструмента Bioreader 6000-F-z (BioSys) и определяли число слотов, площадь слотов и общую оптическую плотность. Результаты представлены в виде общей оптической плотности; данные выражены в виде среднего ± S.E.M.

Как показано на фиг. 9A, количество секретирующих ИФН-γ клеток было значимо увеличено у мышей, получавших лечение антителом против TIGIT 313R12, по сравнению с мышами, получавшими лечение контрольным антителом. Важно отметить, что количество секретирующих ИФН-γ клеток было увеличено только в присутствии пептида AH-1. Указанные результаты показывают, что антитело против TIGIT 313R12 активировало опухолеспецифические CD8+ Т-клетки. Указанная активация может быть прямой или непрямой, т.е. за счет ингибирования супрессорных клеток.

Секретирующие ИЛ-2 клетки детектировали с применением набора ELISpot для ИЛ-2 мыши (MabTech). Клетки выделяли из селезенок мышей-носителей опухолей, получавших лечение антителом против TIGIT 313R12 (n=6) или контрольным антителом совпадающего изотипа (n=6). Спленоциты (5×10^5/лунку) от каждой мыши в каждой экспериментальной группе распределяли в 96-луночный планшет, покрытый антителом, специфическим для ИЛ-2 мыши. Указанные клетки инкубировали в течение 48 ч. Клетки, секретирующие ИЛ-2, детектировали в соответствии с инструкциями производителя. Осуществляли захват изображений с применением инструмента Bioreader 6000-F-z (BioSys) и определяли число слотов, площадь слотов и общую оптическую плотность. Результаты представлены в виде общей

оптической плотности; данные выражены в виде среднего ± S.E.M.

Как показано на фиг. 9B, количество секретирующих ИЛ-2 клеток было незначительно уменьшено у мышей, получавших лечение антителом против TIGIT 313R12, по сравнению с мышами, получавшими лечение контрольным антителом. Уменьшение количества секретирующих ИЛ-2 клеток было эквивалентным в присутствии или в отсутствие пептида АН-1.

Секретирующие ИЛ-4 клетки детектировали с применением набора ELIspot для ИЛ-4 мыши (MabTech). Клетки выделяли из селезенок мышей-носителей опухолей, получавших лечение антителом против TIGIT 313R12 (n=6) или контрольным антителом совпадающего изотипа (n=6). Спленоциты (5×10^5/лунку) от каждой мыши в каждой экспериментальной группе распределяли в 96-луночный планшет, покрытый антителом, специфическим для ИЛ-4 мыши. Указанные клетки инкубировали в течение 48 ч. Клетки, секретирующие ИЛ-4, детектировали в соответствии с инструкциями производителя. Осуществляли захват изображений с применением инструмента Bioreader 6000-F-z (BioSys) и определяли число слотов, площадь слотов и общую оптическую плотность. Результаты представлены в виде общей оптической плотности; данные выражены в виде среднего ± S.E.M.

Как показано на фиг. 9C, количество секретирующих ИЛ-4 клеток значимо снижалось у мышей, получавших лечение антителом против TIGIT 313R12 по сравнению с мышами, получавшими лечение контрольным антителом.

Секретирующие ИЛ-10 клетки детектировали с применением набора ELIspot для ИЛ-10 мыши (MabTech). Клетки выделяли из селезенок мышей-носителей опухолей, получавших лечение антителом против TIGIT 313R12 (n=6) или контрольным антителом совпадающего изотипа (n=6). Спленоциты (5×10^5/лунку) от каждой мыши в каждой экспериментальной группе распределяли в 96-луночный планшет, покрытый антителом, специфическим для ИЛ-10 мыши. Указанные клетки инкубировали в течение 48 ч. Клетки, секретирующие ИЛ-10, детектировали в соответствии с инструкциями производителя. Осуществляли захват изображений с применением инструмента Bioreader 6000-F-z (BioSys) и определяли число слотов, площадь слотов и общую оптическую плотность. Результаты представлены в виде общей оптической плотности; данные выражены в виде среднего ± S.E.M.

Как показано на фиг. 9D, количество секретирующих ИЛ-10 клеток значимо снижалось у мышей, получавших лечение антителом против TIGIT 313R12, по сравнению с мышами, получавшими лечение контрольным антителом.

ИФН-γ обычно продуцируют NK-клетки, CD4+ Т-клетки Th1, CD8+ Т-клетки, антигенпрезентирующие клетки и В-клетки. Результаты исследований предполагают, что ИФН-γ играет роль в опухолевом иммунитете и может представлять собой регулятор противоопухолевой активности, опосредованной другими цитокинами, в частности ИЛ-12 и ИЛ-2. Соответственно, лечение антителом против TIGIT, которое приводит к увеличению количества ИФН-γ, должно усиливать противоопухолевый иммунитет.

ИЛ-4 продуцируют CD4+ клетки Th2, и он индуцирует дифференцировку необученных CD4+ Т-клеток в клетки Th2. Кроме того, ИЛ-4 ингибирует образование клеток Th1, ингибирует продуцирование цитокинов Th1, таких как ФНО-α и ИЛ-12, и ингибирует активацию макрофагов. ИЛ-10 обычно продуцируют клетки Treg и хелперные Т-клетки. Изначально ИЛ-10 был идентифицирован как цитокин Th2, который модулирует рост и/или дифференцировку клеток врожденного иммунитета и подавляет активацию и эффекторные функции Т-клеток, в частности цитотоксических Т-клеток. Позднее было показано, что ИЛ-10 оказывает некоторые иммуностимулирующие эффекты и, соответственно, рассматривается как обладающий плейотропными функциями. Значимое уменьшение количества продуцирующих ИЛ-4 и ИЛ-10 клеток у мышей, получавших лечение антителом против TIGIT, в настоящем исследовании предполагает, что нацеливание на TIGIT может приводить к ингибированию Th2-ответов и может ингибировать клетки Treg и/или функцию Treg.

Пример 8. Анализы клеточной цитотоксичности.

Для анализов Т-клеточной цитотоксичности собирали клетки селезенок мышей-носителей опухолей CT26.WT согласно описанию выше (пример 5). Клетки высевали в 96-луночные планшеты с V-образным дном в культуральную среду RPMI 1640 (Gibco/Life Technologies, Гранд-Айленд, Нью-Йорк) с добавлением 10% (по объему) фетальной бычьей сыворотки (ФБС), 2 мМ L-глутамина, 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Gibco). Целевые клетки CT26.WT метили 10 мкМ кальцеином AM (Life Technologies) в течение 1 ч при 37°C, а затем комбинировали со спленоцитами в соотношении эффекторные: целевые клетки (E:T), составляющем 50:1. После инкубации в течение 4 ч при 37°C собирали бесклеточные супернатанты и количественно определяли высвобождение кальцеина на флуориметре с длиной волны возбуждения, составляющей 485 нм, и длиной волны излучения, составляющей 535 нм. Процент специфического лизиса клеток определяли как

$$\%\ \text{лизиса}=100\times(ER-SR)/(MR-SR),$$

где ER, SR и MR соответствуют экспериментальному, спонтанному и максимальному высвобождению кальцеина, соответственно. Спонтанное высвобождение представляет собой флуоресценцию, испускаемую целевыми клетками, инкубированными в средах отдельно (т.е. в отсутствие эффекторных клеток); максимальное высвобождение определяют путем лизиса целевых клеток равным объемом 10% ДСН.

Как показано на фиг. 10, CD8+ цитотоксические Т-клетки мышей-носителей опухолей CT26.WT при лечении указанных мышей антителом против TIGIT 313R12 демонстрировали увеличенную способность к киллингу целевых клеток CT26.WT по сравнению с клетками мышей, получавших лечение контрольным антителом.

Указанные результаты предполагают, что антитело против TIGIT может повышать антиген-специфический цитотоксическую Т-клеточную активность и, соответственно, усиливать противоопухолевый иммунный ответ. Указанное повышение цитотоксической Т-клеточной активности может быть обусловлено прямым или непрямым эффектом антитела против TIGIT, т.е. ингибированием эффекта супрессорных клеток.

Пример 9. Анализ регуляторных Т-клеток (Treg).

Регуляторные Т-клетки (Treg) играют важнейшую роль в поддержании гомеостаза и предотвращении аутоиммунных ответов. Клетки Treg представляют собой небольшую подгруппу Т-клеток, большинство из которых представлены CD4+ клетками и экспрессируют CD25 (α-цепь рецептора ИЛ-2) и другие связанные с клетками Treg молекулярными маркерами. Foxp3, транскрипционный фактор, был идентифицирован как фактор развития и функции клеток Treg. Foxp3 считался специфическим маркером для определения и идентификации клеток Treg и отделения клеток Treg от других субпопуляций Т-клеток. Однако специфичность Foxp3 в отношении клеток Treg в клетках человека оспаривалась. Другая субпопуляция клеток, помимо CD4+ Treg клеток, представлена CD8+ клетками Treg, и для их развития и функции Foxp3 может быть не настолько важен, как для CD4+ клеток Treg.

Функциональность клеток Treg у мышей, получавших лечение антителом против TIGIT, оценивали путем определения эффекта клеток Treg на пролиферацию необученных CD4+ или CD8+ Т-клеток. Необученные Т-клетки очищали из селезенок не получавших лечения мышей с применением колонки для обогащения по CD3+ Т-клеткам мыши (R&D Systems). Указанные очищенные Т-клетки метили 5 мкМ фиолетовый отслеживающий краситель (VTD; Life Technologies). 2×10^5 меченых VTD Т-клеток инкубировали с покрытыми антителом против CD3 и против CD28 гранулами для стимуляции пролиферации клеток. Клетки Treg выделяли из селезенок мышей-носителей опухолей CT26.WT (см. пример 5), получавших лечение антителом против TIGIT 313R12 (n=6) или контрольным антителом совпадающего изотипа (n=5) с применением набора для выделения Treg мыши (Miltenyi Biotec). Для определения влияния клеток Treg на пролиферацию Т-клеток стимулированные меченые VTD Т-клетки (эффекторы) культивировали совместно с выделенными клетками Treg селезенки мышей, получавших лечение антителом против TIGIT 313R12, и мышей, получавших лечение контрольным антителом (отношение эффекторы:Treg=1:0,5). На 4 день клетки промывали и инкубировали с антителами против CD4 мыши или против CD8 мыши. Клетки оценивали посредством FACS-анализа с применением инструмента FACSCanto II и программного обеспечения FACSDiva v6.1.3 (BD Biosciences). Сигналы VTD снижаются 2-кратно при делении меченых клеток, соответственно, гейт в анализе устанавливали между максимальным сигналом, полученным в указанном анализе без клеток Treg, и минимальным сигналом, полученным без стимуляции антителами против CD3/CD28. Процент клеток в указанной области (пониженная экспрессия VTD) на CD4+ Т-клетках и CD8+ Т-клетках использовали для расчета пролиферации CD4+ и CD8+ Т-клеток. Процент супрессии рассчитывали как

[максимальный сигнал - (сигнал от образца/максимальный сигнал)]×100.

Как показано на фиг. 11, лечение антителом против TIGIT 313R12 не оказывало какого-либо поддающегося наблюдению эффекта на супрессорную функцию происходящих из селезенки клеток Treg в отношении пролиферации CD4+ Т-клеток. И напротив, лечение антителом против TIGIT 313R12 снижало супрессорную функцию происходящих из селезенки клеток Treg на пролиферацию CD8+ Т-клеток приблизительно на 30%.

Указанные результаты предполагают, что лечение антителом против TIGIT может приводить к снижению и/или супрессии функции Treg, т.е. "растормаживанию" иммунного ответа. Снижение функции Treg или супрессия Treg может усиливать общий противоопухолевый иммунный ответ.

Пример 10. Характеризация иммунных клеток мышей-носителей опухолей CT26.WT, получавших лечение антителом против TIGIT 313R12.

Для лучшей характеризации иммунных клеток мышей-носителей опухолей CT26.WT, получавших лечение антителом против TIGIT 313R12, спленоциты, выделенные из индивидуальных мышей, анализировали посредством FACS. Клетки CT26.WT (20000 клеток/мышь) подкожно инъецировали в заднюю боковую область 6 мышам Balb/c возрастом 6-8 недель. Опухолям позволяли расти в течение 10 дней до достижения размера, составлявшего приблизительно 50 мм^3. Мыши получали лечение в виде 0,25 мг/мышь антитела против TIGIT 313R12 или контрольного антитела совпадающего изотипа (n=10-20 на группу). Мышей дозировали путем внутрибрюшинной инъекции дважды в неделю. Проводили мониторинг роста опухоли и измеряли объемы опухолей электронным калипером. По шесть мышей из каждой группы лечения использовали для анализа. На 32 день после инъекции клеток (через 1 день после введения последней дозы антитела) выделяли спленоциты. Спленоциты (1×10^6) инкубировали в течение 10 мин с рекомбинантным белком Fc для блокирования неспецифического связывания, а затем инкубирова-

ли с конъюгированными с флуорохромом антителами в 100 мкл окрашивающего FACS-буфера (HBSS с 2% термоинактивированной телячьей сыворотки) в течение 20 мин на льду. Несвязанные антитела удаляли посредством промывания, и метили погибшие клетки фиксируемым красителем для детекции жизнеспособности. Клетки фиксировали в 2% параформальдегиде в течение 20 мин при комнатной температуре и анализировали с применением инструмента FACSCanto II и программного обеспечения FACSDiva v6.1.3 (BD Biosciences).

Тотальные Т-клетки идентифицировали с применением антитело против CD3e мыши, CD4+ Т-клетки - с применением антитела против CD4 мыши, а CD8+ Т-клетки - с применением антитела против CD8 мыши. Клетки центральной памяти идентифицировали с применением антитело против CD44 мыши/человека, а эффекторные клетки памяти идентифицировали с применением антитела против CD62L человека. FACS-окрашивание выполняли согласно описанию выше с применением антитела против CD8b мыши (клон 53-5.8, BioLegend), антитела против CD4 мыши (клон GK1.5, BioLegend), антитела против CD62L мыши (клон MEL-14, BioLegend) и антитела против CD44 мыши (клон 1M7, BioLegend). Проводили анализ клеток на на экспрессию $CD44^{high}CD62L^{high}$, соответствующую клеткам центральной памяти, и экспрессию $CD44^{high}CD62L^{low}$, соответствующую эффекторные клетки памяти (гейтированным по CD8+ Т-клеткам).

FACS-анализ показал, что доля популяции Т-клеток от общего числа живых спленоцитов у мышей-носителей опухолей CT26.WT, получавших лечение антителом против TIGIT 313R12, была увеличена по сравнению с популяцией Т-клеток у мышей, получавших лечение контрольным антителом (фиг. 12A). Процент CD4+ Т-клеток (от общего числа живых клеток), а также процент CD8+ Т-клеток (от общего числа живых клеток) увеличивался у мышей, получавших лечение антителом 313R12, по сравнению с мышами, получавшими лечение контрольным антителом (фиг. 12B и 12C). Кроме того, процент клеток центральной памяти в популяции CD4+ Т-клеток увеличивался (фиг. 12D). Однако процент клеток центральной памяти в популяции CD8+ Т-клеток не увеличивался (фиг. 12E).

Эти данные показали, что лечение антителом против TIGIT увеличивает процент популяций как CD4+, так и CD8+ Т-клеток. Указанные результаты согласуются с усилением иммунного ответа.

Для оценки эффекта антитела против TIGIT на экспрессию мишени анализировали экспрессию TIGIT на клетках Treg с помощью проточной цитометрии. Согласно описанию в настоящем документе, клетки Treg представляют собой супрессорные клетки; CD4+ клетки Treg, как известно, экспрессируют транскрипционный фактор Foxp3. Согласно описанию выше выделяли спленоциты мышей-носители опухолей CT26.WT, получавших лечение антителом против TIGIT 313R12 или контрольным антителом. Спленоциты (1×10^6) инкубировали в течение 10 мин с рекомбинантным белком Fc для блокирования неспецифического связывания, а затем инкубировали с антителом против TIGIT 313R12 и антителом против CD4 мыши в 100 мкл окрашивающего FACS-буфера (HBSS с 2% термоинактивированной телячьей сыворотки) в течение 20 мин на льду. После промывания окрашивающим FACS-буфером клетки метили фиксируемым красителем для детекции жизнеспособных клеток, фиксировали и пермеабилизировали в течение ночи. После пермеабилизации клетки двукратно промывали 1X буфером для пермеабилизации. Клетки окрашивали с применением антитела против Foxp3 мыши в течение 30 мин на льду, промывали и фиксировали 2% формальдегидом в течение 20 мин при комнатной температуре. Проточную цитометрию проводили с применением инструмента FACSCanto II и выполняли анализ данных с применением программного обеспечения FACSDiva v6.1.3 (BD Biosciences).

Как показано на фиг. 13A, процент экспрессирующих TIGIT спленоцитов от общего числа спленоцитов снижался у мыши-носителей опухолей CT26.WT, получавших лечение антителом против TIGIT 313R12, по сравнению со спленоцитами мышей-носителей опухолей, получавших лечение контрольным антителом. Процент Foxp3+CD4+ клеток (соответствующий клеткам Treg) от общего числа CD4+ клеток составлял приблизительно 22-23% в обеих группах мышей и на него, по-видимому, не влияло лечение антителом против TIGIT (фиг. 13B). Однако процент положительных по TIGIT клеток Treg (от общего числа клеток Treg) резко снижался в популяции спленоцитов мышей-носителей опухолей CT26.WT, получавших лечение антителом против TIGIT 313R12, по сравнению с процентом для спленоцитов мышей-носителей опухолей, получавших лечение контрольным антителом (фиг. 13C). И напротив, процент отрицательных по TIGIT клеток Treg был незначительно увеличен в популяции спленоцитов мышей-носителей опухолей CT26.WT, получавших лечение антителом против TIGIT 313R12, по сравнению с популяцией спленоцитов мышей-носителей опухолей, получавших лечение контрольным антителом (фиг. 13D).

Указанные результаты предполагают, что антитело против TIGIT 313R12 обеспечивало истощение по положительным по TIGIT клеткам, в частности клеткам Treg. Однако указанное снижение количества положительных по TIGIT клеток по оценке с помощью FACS может быть обусловлено интернализацией белков TIGIT и/или понижающей регуляцией экспрессии TIGIT на поверхности клеток, а не фактическим истощением по клеткам.

Супрессорные клетки миелоидного происхождения (клеток СКМП) представляют собой гетерогенное семейство миелоидных клеток и, как было показано, являются мощными супрессорами как адаптивного, так и врожденного иммунитета. Клетки СКМП подавляют пролиферацию и активацию CD4+

Т-клеток и CD8+ Т-клеток и облегчают образование клеток Treg. Считается, что клетки СКМП способствуют прогрессированию рака путем ингибирования противоопухолевого иммунного ответа, стимуляции ангиогенеза и создания преметастатической окружающей среды. Клетки СКМП характеризуются экспрессией на поверхности клеток антигенов дифференцировки миелоидной линии Gr1 и CD11b. Экспрессия Gr1 в основном ограничена клетками гранулоцитарной линии, а CD11b представляет собой интегрин клеточной поверхности, обнаруживаемый на поверхности макрофагов, гранулоцитов, NK-клеток и Т-клеток. У мышей клетки СКМП могут быть подразделены на два субпопуляции, гранулоцитарные клетки СКМП (G-СКМП) и моноцитарные клетки СКМП (M-СКМП), частично на основании указанных маркеров. Клетки ГСКМП, как правило, имеют многолопастные ядра и фенотип CD11b+Gr1^{high}, тогда как клетки МСКМП имеют моноцитарную морфологию и фенотип CD11b+Gr1^{low}. Обе популяции клеток СКМП, как было показано, подавляют Т-клеточный ответ посредством нескольких механизмов, включая увеличение продуцирования аргиназы, индуцируемой синтазы оксида азота (iNOS), оксида азота и активных форм кислорода. Соответственно, клетки СКМП вносят вклад в иммуносупрессивное микроокружение опухоли и могут ограничивать эффекты противоопухолевого иммунного ответа.

Миелоидные клетки, в частности, клетки СКМП мышей-носителей опухолей CT26.WT, получавших лечение антителом против TIGIT 313R12 или контрольным антителом, анализировали с помощью FACS. Спленоциты (1×10^6) инкубировали в течение 10 мин с рекомбинантным белком Fc для блокирования неспецифического связывания, и затем инкубировали с конъюгированными с флуорохромом антителами в 100 мкл окрашивающего FACS-буфера (HBSS с 2% термоинактивированной телячьей сыворотки) в течение 20 мин на льду. Затем указанные клетки инкубировали с антителом против CD11b мыши и антителом против Gr1 мыши. Несвязанные антитела удаляли посредством промывания и клетки метили фиксируемым красителем для детекции жизнеспособности. Клетки фиксировали в 2% параформальдегиде в течение 20 мин при комнатной температуре и анализировали с применением инструмента FACSCanto II и программного обеспечения FACSDiva v6.1.3 (BD Biosciences).

Как показано на фиг. 14A, процент CD11b+ миелоидных клеток (от общего числа живых клеток) из селезенок мышей-носителей опухолей CT26.WT, получавших лечение антителом против TIGIT 313R12, снижался приблизительно на 25% по сравнению с процентом CD11b+ миелоидных клеток мышей-носителей опухолей, получавших лечение контрольным антителом. Процент CD11b+Gr1+ клеток СКМП (от общего числа CD11b+ миелоидных клеток) в селезенках мышей-носителей опухолей, получавших лечение антителом против TIGIT 313R12, снижалось приблизительно на 45% по сравнению с процентом CD11b+Gr1+ клеток СКМП мышей-носителей опухолей, получавших лечение контрольным антителом (фиг. 14B). В популяции СКМП процент клеток ГСКМП (идентифицированных как CD11b+Gr1^{high}) из селезенок мышей-носителей опухолей CT26.WT, получавших лечение антителом против TIGIT 313R12, снижался приблизительно на 66%, но процент клеток МСКМП (идентифицированных как CD11b+Gr1^{low}) из селезенок мышей-носителей опухолей CT26.WT, получавших лечение антителом против TIGIT 313R12, увеличивался приблизительно на 30% (фиг. 14C и 14D, соответственно).

Указанные результаты предполагают, что лечение антителом против TIGIT может усиливать противоопухолевый ответ путем снижения супрессорной активности специфических иммунных клеток, т.е. клеток СКМП.

Пример 11. In vivo ингибирование роста опухоли антителом против TIGIT.

Renca представляет собой полученную от Balb/c линию клеток почечной аденокарциномы из ATCC. Клетки Renca (5×10^5 клеток/мышь) имплантировали подкожно в заднюю боковую область мышам Balb/c возрастом 6-8 недель. Опухолям позволяли расти в течение 7 дней до достижения объема, составляющего приблизительно 43 мм^3. Мыши получали лечение в виде 0,25 мг/мышь антитела против TIGIT 313R12 (антитело mIgG2a) или контрольного антитела mIgG2a (n=10 на группу). Мышей дозировали путем внутрибрюшинной инъекции дважды в неделю в течение 3 недель. Проводили мониторинг роста опухоли и измеряли объемы опухолей электронным калипером на 7, 10, 14, 17, 21 и 24 дни.

Как показано на фиг. 15, антитело против TIGIT 313R12 выраженно ингибировало рост опухоли по сравнению с контрольным антителом совпадающего изотипа. Всех контрольных мышей умерщвляли к 28 дню из-за размеров опухолей. И, напротив, у 8 из 10 мышей, получавших лечение антителом 313R12, на 28 день опухоли регрессировали, а у 5 из указанных мышей детектируемые опухоли отсутствовали. Пять из исходных десяти мышей оставляли; детектируемые опухоли отсутствовали в течение по меньшей мере 100 дней после инъекции.

Эти результаты указывают на эффективность противоопухолевой активности антитела против TIGIT 313R12 при нескольких разных типах опухолей.

Пример 12. In vivo ингибирование роста опухоли антителом против TIGIT. Исследование дозы.

Поскольку было показано, что антитело против TIGIT эффективно ингибирует рост опухоли, проводили исследование диапазона доз. Клетки линии опухоли ободочной кишки мыши CT26.WT имплантировали подкожно (30000 клеток/мышь) мышам Balb/c; опухолям позволяли расти до достижения среднего размера, составляющего приблизительно 35 мм^3. Мыши получали лечение в виде 30, 15, 10, 5, 3, 1 или 0,5 мг/кг антитела против TIGIT 313R12 или контрольного антитела (n=10 на группу). Мышей дозиро-

вали путем внутрибрюшинной инъекции один раз в неделю, всего вводили 3 дозы. Проводили мониторинг роста опухоли и измеряли объемы опухолей электронным калипером в заданные моменты времени.

На фиг. 16 приведены средние объемы опухолей для каждой экспериментальной группы. Лечение антителом против TIGIT 313R12 выражение ингибировало рост опухолей CT26.WT во всех дозах, включая минимальный уровень, составляющий 0,5 мг/кг. Как показано в табл. 4, на 20 день опухоли регрессировали по меньшей мере у 40% мышей при всех уровнях дозы. Во всех получавших лечение группах у отдельных мышей опухоли регрессировали до недетектируемого уровня. Кривая зависимости "доза-ответ" в настоящем эксперименте не наблюдалась, что может быть обусловлено размером опухолей в начале лечения.

Таблица 4

Доза, мг/кг	Число мышей, у которых произошел регресс опухолей	Число мышей с недетектируемыми опухолями
Контрольное антитело	1/10	0/10
0,5	8/10	3/10
1	6/10	1/10
3	8/10	4/10
5	7/10	3/10
10	5/10	3/10
15	4/10	2/10
30	7/10	4/10

Указанные результаты демонстрируют активность антитела против TIGIT 313R12 в качестве иммунотерапевтического агента. В целом, указанные результаты были неожиданными в том смысле, что для обеспечения значимого противоопухолевого эффекта требовалось незначительное количество антитела против TIGIT.

Пример 13. In vivo ингибирование роста опухоли антителом против TIGIT и антителом против PD-L1.

Клетки линии опухоли ободочной кишки мыши CT26.WT имплантировали подкожно (30000 клеток/мышь) мышам Balb/c; в первый день лечения (10 день после имплантации) средний размер опухолей составлял приблизительно 105 мм^3. Мыши получали лечение в виде 0,25 мг/мышь антитела против TIGIT 313R12, антитела против PD-L1, комбинацией антитела 313R12 и антитела против PD-L1, или контрольного антитела (n=10-20 на группу). Мышам вводили антитела дважды в неделю в течение 3 недель. Проводили мониторинг роста опухоли и измеряли объемы опухолей электронным калипером.

Как показано на фиг. 17B, лечение антителом против TIGIT 313R12 выражение ингибировало рост опухолей CT26.WT у значительного процента мышей. Следует отметить, что лечение антителом против TIGIT 313R12 способно не только ингибировать рост опухолей у большинства мышей, но и индуцировать регрессию индивидуальных опухолей, часто до недетектируемых уровней. Лечение антителом против PD-L1 было значительно менее успешным в отношении ингибирования роста опухолей при применении в качестве единственного агента (фиг. 17C). Лечение комбинацией антитела против TIGIT 313R12 и антитела против PD-L1 ингибировало рост опухоли в большей степени, чем любым из агентов по отдельности (фиг. 17D). Средний объем опухолей приведен на фиг. 17E; процент выживания мышей в каждой группе приведен на фиг. 17F.

Одним из способов оценки присутствия и/или функциональности популяции противоопухолевых клеток памяти является повторная стимуляция мышей, ранее получавших лечение, свежими опухолевыми клетками. Мышей (из исследований, описанных выше), ранее получавших лечение антителом против TIGIT 313R12, антителом против mPD-L1 или комбинацией антитела 313R12 и антитела против mPD-L1, использовали в исследовании с повторной стимуляцией. Мышей, у которых произошел полный регресс опухолей и отсутствовали детектируемые опухоли на протяжении по меньшей мере 128 дней после первой опухолевой инъекции, повторно стимулировали опухолевыми клетками CT26.WT (30000 клеток). Мыши, которых подвергали повторной опухолевой стимуляции, получали последнюю дозу для лечения за 100 дней до повторной стимуляции. В качестве контрольной группы использовали нестимулированных мышей Balb/c (n=10), которым инъецировали опухолевые клетки CT26.WT (30000 клеток). Проводили мониторинг роста опухоли и измеряли объемы опухолей электронным калипером в заданные моменты времени. Данные выражают в виде среднего ± S.E.M.

Средний объем опухолей CT26.WT у нестимулированных ранее мышей неуклонно возрастал до 28 дня и составлял приблизительно 1750 мм^3. В ходе предыдущего эксперимента только у двух мышей, ранее получавших лечение антителом против PD-L1, произошел полный регресс опухолей, однако при этом указанные две мыши демонстрировали полный иммунитет к повторной опухолевой стимуляции. У 4 мышей из ранее получавших лечение антителом против TIGIT произошел полный регресс опухолей; ни у одной из указанных мышей не наблюдался рост опухолей после повторной стимуляции; они демонстрировали полный иммунитет к повторной опухолевой стимуляции. Кроме того, у 7 мышей, ранее получавших лечение комбинацией антитела 313R12 и антитела против PD-L1, произошел полный регресс опухолей; указанные мыши демонстрировали полный иммунитет к опухолевой стимуляции.

Мыши, получавшие лечение антителом против TIGIT, в виде единственного агента или в комбинации с антителом против PD-L1, по-видимому, были хорошо защищены при повторной стимуляции опухолевыми клетками CT26.WT. Указанные результаты предполагают наличие иммуногенной памяти после лечения антителом против TIGIT, в виде единственного агента или в комбинации с ингибитором контрольной точки.

Пример 14. In vivo ингибирование роста опухоли антителом против TIGIT и антителом против PD-1.

Клетки линии опухоли ободочной кишки мыши CT26.WT имплантировали подкожно (30000 клеток/мышь) мышам Balb/c; на первый день лечения (7 день после имплантации) средний размер опухолей составлял приблизительно 62 мм^3. Мыши (n=15) получали лечение в виде 12,5 мг антитела против TIGIT 313R12, антитела против PD-1, комбинации антитела 313R12 и антитела против PD-1, или контрольного антитела (n=15 на группу). Мышам вводили указанные антитела путем внутрибрюшинной инъекции дважды в неделю в течение 3 недель. Проводили мониторинг роста опухоли и измеряли объемы опухолей электронным калипером.

Как показано на фиг. 18B, лечение антителом против TIGIT 313R12 выраженно ингибировало рост опухоли. Как видно из приведенных выше примеров, лечение 313R12 способно не только ингибировать рост опухолей, но и индуцировать регрессию некоторых опухолей. Лечение комбинацией антитела против TIGIT 313R12 и антитела против PD-1 ингибировало рост опухоли в большей степени, чем лечение каждым из указанных агентов по отдельности (фиг. 18D). Средний объем опухоли в четырех группах на 24 день показан на фиг. 18E.

Мышей, ранее получавших лечение антителом против TIGIT 313R12, антителом против mPD-1 или комбинацией антител 313R12 и против mPD-L1 использовали в исследовании с повторной стимуляцией. Мышей, у которых произошел полный регресс опухолей и отсутствовали детектируемые опухоли на протяжении по меньшей мере 100 дней после первой опухолевой инъекции, повторно стимулировали опухолевыми клетками CT26.WT (60 000 клеток). В качестве контрольной группы использовали нестимулированных мышей Balb/c (n=10), которым инъецировали опухолевые клетки CT26.WT (60000 клеток). Проводили мониторинг роста опухоли и измеряли объемы опухолей электронным калипером в заданные моменты времени. Данные выражают в виде среднего ± S.E.M.

Средний объем опухолей CT26.WT у нестимулированных ранее мышей неуклонно возрастал; на 21 день средний объем опухоли составлял приблизительно 1250 мм^3. В ходе предыдущего эксперимента было получено 13 мышей, у которых произошел полный регресс опухолей, ранее получавших лечение комбинацией антитела 313R12 и антитела против PD-1; указанные мыши демонстрировали полный иммунитет к опухолевой стимуляции.

Указанные результаты дополнительно подтверждают идею, заключающуюся в том, что антитело против TIGIT 313R12 представляет собой очень мощный иммунотерапевтический агент, даже при введении в виде индивидуального агента. Кроме того, эффективность антитела против TIGIT может быть дополнительно усилена путем комбинирования с другими иммунотерапевтическими агентами.

Пример 15. Получение моноклональных антител против TIGIT.

Получали антитела против аминокислот 22-141 рекомбинантного TIGIT человека (R&D Systems) и/или аминокислот 22-138 рекомбинантного TIGIT человека (Sino Biological Inc.). Мышей (n=3) иммунизировали TIGIT с применением стандартных техник. Проводили скрининг сыворотки индивидуальных мышей на антитела против TIGIT человека приблизительно через 70 дней после первой иммунизации с применением FACS-анализа. Животное с максимальным титром антитела выбирали для последней дополнительной стимуляции антигеном, после чего выделяли клетки селезенки для получения гибридомы. Клетки SP2/0 использовали в качестве партнеров для слияния с клетками селезенок мыши. Гибридомные клетки высевали в количестве 1 клетки на лунку в 96-луночные планшеты и проводили скрининг супернатантов против TIGIT человека посредством FACS-анализа.

Для FACS-скрининга на антитела против TIGIT конструировали химерный слитый белок, обеспечивающий экспрессию на поверхности клеток внеклеточного домена TIGIT человека (FLAG-hTIGIT-CD4TM-GFP), и трансфицировали клетки HEK-293T. Через 48 ч трансфицированные клетки суспендировали в ледяном ФСБ, содержащем 2% ФБС и гепарин, и инкубировали на льду в присутствии 50 мкл супернатантов гибридом в течение 30 мин. Проводили вторую инкубацию с 100 мкл ФЭ-конъюгированного вторичного антитела против человека Fc для детекции клеток, связанные с антителом. Клетки инкубировали с антителом против FLAG (Sigma-Aldrich) в качестве положительного контроля и антителом против ФЭ в качестве отрицательного контроля. Указанные клетки анализировали на инструменте FACSCalibur (BD Biosciences) и обрабатывали данные с применением программного обеспечения FlowJo.

Было идентифицировано несколько гибридом, связывающих TIGIT человека, и было выбрано антитело 313M26. Последовательности аминокислот вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи 313M26 представлены последовательностями SEQ ID NO: 63 и SEQ ID NO: 64, соответственно. Последовательности нуклеотидов вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи 313M26 представлены последовательностями SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 66, соответственно.

Антитело 313M26 гуманизировали с применением стандартных техник, известных специалистам в

данной области техники. Гуманизированная версия 313M26 называется в настоящем документе 313M32 и представляет собой антитело IgG1. Формат гуманизированной вариабельной области тяжелой цепи 313M32 изменяли, помещая на остов IgG4; ее комбинация с легкой цепью 313M32 называется 313M33. Последовательности аминокислот вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи 313M32 (и 313M33) представлены последовательностями SEQ ID NO: 67 и SEQ ID NO: 68, соответственно. Последовательности нуклеотидов вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи 313M32 представлены последовательностями SEQ ID NO: 73 и SEQ ID NO: 74, соответственно. Области CDR тяжелой цепи и легкой цепи 313M26/313M32 перечислены в табл. 2 в настоящем документе (SEQ ID NO: 57-62). Последовательность аминокислот тяжелой цепи 313M32 с предсказанной сигнальной последовательностью представлена последовательностью SEQ ID NO: 69; и без сигнальной последовательности - последовательностью SEQ ID NO: 70; последовательность аминокислот легкой цепи 313M32 с предсказанной сигнальной последовательностью представлена последовательностью SEQ ID NO: 71, и без сигнальной последовательности - последовательностью SEQ ID NO: 72. Последовательности нуклеотидов тяжелой цепи и легкой цепи 313M32 представлены последовательностями SEQ ID NO: 75 и SEQ ID NO: 76, соответственно. Последовательность аминокислот тяжелой цепи 313M33 с предсказанной сигнальной последовательностью представлена последовательностью SEQ ID NO: 83, и без сигнальной последовательности - последовательностью SEQ ID NO: 82; последовательность аминокислот легкой цепи 313M33 с предсказанной сигнальной последовательностью представлена последовательностью SEQ ID NO: 71, и без сигнальной последовательности - последовательностью SEQ ID NO: 72. Последовательности нуклеотидов тяжелой цепи и легкой цепи 313M33 представлены последовательностями SEQ ID NO: 84 и SEQ ID NO: 76, соответственно.

Плазмида, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи антитела 313M32, была депонирована в Американской коллекции типовых культур (ATCC), 10801 University Boulevard, Манассас, Виргиния, США, согласно условиям Будапештского договора от 11 августа 2015 г., и обозначается PTA-122346. Плазмида, кодирующая легкую цепь антитела 313M32, была депонирована в базу ATCC, 10801 University Boulevard, Манассас, Виргиния, США, согласно условиям Будапештского договора от 11 августа 2015 г., и обозначается PTA-122347.

Проводили скрининг гуманизированного антитела против TIGIT 313M32 на наличие связывания с белками TIGIT нескольких разных видов. Было определено, что 313M32 выраженно связывает TIGIT человека и не связывает TIGIT любых других протестированных видов, в том числе мыши, крысы, морской свинки, кролика, игрунковых, свиньи, собаки, макаки-резуса и яванского макака. Этим оно отличается от другого антитела против TIGIT, полученного OncoMed Pharmaceuticals, 313R19, которое связывало TIGIT всех указанных видов, за исключением морской свинки. Антитело 313R19 представляет собой гуманизированную версию антитела кролика против TIGIT (313R12), которое изначально было идентифицировано как связывающее TIGIT как мыши, так и человека. В табл. 5 приведена обобщенная информация об антителах против TIGIT и связывании с TIGIT мыши, человека, яванского макака и макака-резуса.

Таблица 5

Антитело	Происхождение	Остов	Тип	Связывание mTIGIT	Связывание hTIGIT	Связывание cynoTIGIT	Связывание rhTIGIT
313R12	Кролик	mIgG2a		Да	Да	Нет	Нет
313R19	313R12	hIgG1	Гуманизированное	Да	Да	Да	Да
313M26	Мышь	mIgG2a		Нет	Да	Н/О	Н/О
313M32	313M26	hIgG1	Гуманизированное	Нет	Да	Нет	Нет

Пример 16. FACS-анализ блокирования связывания TIGIT человека с PVR антителом против TIGIT.

Клеточный поверхностный белок TIGIT человека получали путем лигирования аминокислот 22-141 TIGIT человека в трансмембранный домен CD4 и C-концевую белковую метку GFP с применением стандартных техник рекомбинантной ДНК (hTIGIT-CD4TM-GFP). Конструкции PVR-Fc получали с применением стандартных техник рекомбинантной ДНК. В частности, внеклеточный домен PVR человека лигировали внутрь рамки в Fc-область кролика, и рекомбинантный белок hPVR-rbFc экспрессировали в клетках CHO. Слитые белки очищали из клеточной культуральной среды с применением хроматографии с белком A.

Клетки HEK-293T транзиентно трансфицировали конструкцией hTIGIT-CD4TM-GFP. Через 16 ч трансфицированные клетки суспендировали в ледяном HBSS, содержащем 2% ФБС и гепарин, и инкубировали на льду с 0,5 мкг/мл слитого белка hPVR-rbFc в присутствии антител против TIGIT 313R19, 313M26 или 313M32 в течение 60 мин. Антитело 313R19 представляет собой гуманизированную версию антитела кролика против TIGIT. 313R19 связывает мышь и TIGIT человека. Указанные антитела тестировали в концентрациях, составляющих 10, 2 и 0,4 мкг/мл. В качестве контроля клетки инкубировали без антитела или без hPVR-rbFc. Вторую инкубацию со 100 мкл ФЭ-конъюгированного вторичного антитела

против Fc кролика выполняли для детекции клеток, которые связывают слитый белок hPVR-rbFc. Указанные клетки анализировали на инструменте FACSCanto (BD Biosciences); данные обрабатывали с применением программного обеспечения FlowJo.

Как показано на фиг. 19A, в отсутствие любого антитела против TIGIT происходило выраженно связывание hPVR-rbFc с hTIGIT, экспрессируемым на поверхности клеток HEK-293T. Все три антитела против TIGIT блокировали связывание hPVR-rbFc с hTIGIT при максимальной концентрации, составляющей 10 мкг/мл. Однако при более низких концентрациях, составляющих 2 и 0,4 мкг/мл антитела, антитело 313R19 не блокировало связывание hPVR-rbFc с TIGIT. И напротив, антитело против hTIGIT 313M32 выражение блокировало связывание hPVR-rbFc с hTIGIT в концентрации 2 мкг/мл, и уровень блокады был выше, чем в случае исходного антитела мыши 313M26. Указанные результаты предполагают, что аффинность гуманизированного антитела 313M32 в отношении hTIGIT была выше, чем аффинность исходного антитела 313M26 и антитела 313R19. Проводили дополнительный эксперимент с применением антитела 313R19 и антитела 313M32 в концентрациях, составляющих 10, 5, 2,5 и 1,25 мкг/мл (фиг. 19B). Результаты указанных двух исследований предполагают, что аффинность антитела 313M32 в отношении hTIGIT приблизительно в 5 раз выше, чем аффинность антитела 313R19. Дополнительно, предварительные результаты анализа Biacore показали, что аффинность 313R19 составляла 2 нМ, а аффинность 313M32 составляла 0,4 нМ.

Пример 17. Сигнализация TIGIT и фосфорилирование TIGIT.

Фосфорилирование TIGIT по цитоплазматическому "хвосту" происходит после взаимодействия с его контррецептором PVR. Фосфорилирование TIGIT представляет собой начало каскада, который включает нижестоящие события, влияющие на другие известные сигнальные пути. Соответственно, оценка фосфорилирования TIGIT может обеспечивать информацию о функции TIGIT и эффекте антагониста TIGIT.

В клетках линии CD4+ T-клеток человека Jurkat отсутствует экспрессия TIGIT человека согласно оценке с применением ПЦР в реальном времени и FACS (данные не показаны). Для получения экспрессирующей TIGIT линии клеток клетки Jurkat инфицировали лентивирусной конструкцией, экспрессирующей TIGIT человека (hTIGIT), меченый FLAG, и зеленый флуоресцентный белок (GFP). Положительные по GFP клетки были отсортированы в 96-луночные планшеты с применением клеточного сортера FACSAria II (BD Biosciences), одиночные клетки размножали с получением клонов, и выбирали клональную линию клеток (Jurkat-hTIGIT).

В клетках B-клеточной лимфомы человека 721.221 отсутствует экспрессия PVR согласно оценке с применением ПЦР в реальном времени и FACS (данные не показаны). Для получения экспрессирующей PVR линии клеток клетки 721.221 инфицировали лентивирусной конструкцией, экспрессирующей человека PVR (hPVR) и GFP. Положительные по GFP клетки были отсортированы в 96-луночные планшеты с применением клеточного сортера FACSAria II (BD Biosciences), одиночные клетки размножали с получением клонов, и выбирали клональную линию клеток (721.221-hPVR).

Для оценки фосфорилирования TIGIT в ответ на PVR клетки Jurkat-hTIGIT инкубировали в не содержащих сыворотки средах в течение 2 ч при 37°C. Затем указанные клетки предварительно обрабатывали 20 мкг/мл антител против TIGIT 313R19, 313M26 или 313M32, или контрольного антитела в течение 20 мин при комнатной температуре. Jurkat-hTIGIT клетки смешивали с исходными клетками 721.221 или клетками 721.221-mPVR с соотношением клеток, составляющим 5:1, и инкубировали в течение 5 мин при 37°C в присутствии ингибитора тирозинфосфатазы (10 мМ ортованадат натрия, New England Biolabs). Получали клеточные лизаты и иммунопреципитировали с покрытыми антителом против FLAG магнитными гранулами, которые захватывали меченые FLAG hTIGIT белки. Иммунопреципитаты отделяли на 4-12% бис-Tris гели (Novex/Life Technologies) и переносили на нитроцеллюлозные мембраны с применением аппарата iBlot 2 (Life Technologies). Мембраны инкубировали с антитирозиновым антителом, конъюгированным с пероксидазой хрена и фосфорилированным TIGIT (pTIGIT), визуализировали с применением стандартных реагентов для детекции. Присутствие тотального TIGIT оценивали с применением антитела против FLAG (Cell Signaling Technology).

В ответ на hPVR-экспрессирующие опухолевые клетки hTIGIT в клетках Jurkat наблюдалось выраженное фосфорилирование. В присутствии антител против TIGIT, в частности антитела 313M32, указанное фосфорилирование было ингибировано (фиг. 20).

Пример 18. Картирование эпитопов.

Картирование эпитопов антител против hTIGIT.

Для идентификации связывающего антитело 313M32 эпитопа выполняли анализ с рядом вариантов TIGIT человека со специфическими заменами аминокислот. Указанные варианты были основаны на различиях последовательностей аминокислот TIGIT человека и TIGIT яванского макака, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 77, соответственно. Последовательность аминокислот TIGIT макака-резуса (SEQ ID NO: 78) идентична TIGIT яванского макака (фиг. 21). В аминокислотных вариантах остатки аминокислот, присутствующие в TIGIT яванского макака, вводят в соответствующие положения в TIGIT человека. Полученные варианты hTIGIT содержат замены в положениях (1) E36K и I41V; (2) T51M, (3) Q62H и Q64H, (4) D72E, (5) S78Y и S80A, (6) V100M, (7) I109T и T119R; и (8) G135S. Каждый вариант hTIGIT получали

с применением конструкции hTIGIT (AK 22-141)-CD4TM-GFP, описанной в примере 15.

Варианты TIGIT оценивали с помощью FACS с антителами против hTIGIT. Клетки HEK-293T транзиентно трансфицировали hTIGIT-CD4TM-GFP, mTIGIT-CD4TM-GFP или одним из вариантов конструкций hTIGIT-CD4TM-GFP. Через 16 ч трансфицированные клетки суспендировали в ледяном HBSS, содержащем 2% ФБС, и инкубировали на льду с 1 мкг/мл антител против hTIGIT 313R12, 313M32 или 313M34 в течение 30 мин. 313M34 представляет собой антитело против hTIGIT, которое получали на основе последовательностей аминокислот антитела 10A7, описанного в публикации США 2009/0258013. Антитело 10A7 представляет собой антитело против TIGIT мыши, которое связывает как TIGIT мыши, так и TIGIT человека. Вторую инкубацию с 50 мкл ФЭ-конъюгированного вторичного антитела против Fc выполняли для детекции клеток, которые связывают антитела. Клетки анализировали на инструменте FACSCanto (BD Biosciences), и данные обрабатывали с применением программное обеспечение FlowJo.

Как показано на фиг. 22, антитело 313M32 не связывалось с вариантом TIGIT 3 с заменами в положениях остатков аминокислот 62 и 64, и вариантом TIGIT 7 с заменами в положениях остатков аминокислот 109 и 119. Сохранялось выраженное связывание указанного антитела с hTIGIT и вариантами TIGIT 1, 2, 4, 5, 6 и 8. Остатки аминокислот 62, 64, 109 и 119 выделены черным на изображении кристаллической структуры TIGIT, связанного с PVR (фиг. 23). Структура TIGIT человека представлена в виде сферы, а структура PVR - в виде ленты. Положения аминокислот показывают, что антитело 313M32 связывает hTIGIT в области, которая должна блокировать связывание и/или вмешиваться в связывание PVR. Следует отметить, что также отсутствует связывание антитела 313R12 с вариантом TIGIT 7 с заменами в положениях остатков аминокислот 109 и 119, что предполагает, что 313R12 связывает эпитоп, перекрывающийся с эпитопом, который связывает 313M32. Интересно, что на связывание антитела 313M34 с TIGIT не влияют замены аминокислот в варианте TIGIT 3 или варианте 7, однако влияет замена остатка аминокислоты в положении 100 варианта TIGIT 6. Этот результат показывает, что антитело 313M34 не связывает тот же эпитоп, что и антитело 313M32. Относительные положения критических связывающих остатков для антител 313M32 и 313M34 на TIGIT отмечены на изображении на фиг. 23.

Для подтверждения того, что антитела 313M26 (исходное антитело мыши против hTIGIT для 313M32) и 313R19 (гуманизированное антитело кролика против hTIGIT, полученное из 313R12) связывает общий эпитоп, проводили конкурентные исследования. Поскольку Fc-части антител 313M26 и 313R19 отличаются, т.е. представляют собой Fc мыши и Fc человека, соответственно, может быть определено связывание одного антитела (313R19) в присутствии или в отсутствие второго антитела (313M26). Вкратце, клетки HEK-293T транзиентно трансфицировали экспрессионным вектором, кодирующим TIGIT человека-CD4TM-GFP. Клетки инкубировали в течение 1 ч с 0,5 мкг антитела 313M19 и избытком антитела 313M26 (от 50 до 0,78 мкг/мл, 2-кратные разведения). Клетки промывали и инкубировали с флуоресцентно-меченым вторичным антителом, специфическим для Fc человека, и анализировали с помощью проточной цитометрии.

Как показано на фиг. 24A, антитело 313M26 конкурировало с 313R19 за связывание с hTIGIT, а избыток 313M26 эффективно блокировал связывание 313R19 с hTIGIT. Эти данные показывают, что 313M26/313M32 и 313R12/313R19 связываются с перекрывающимися эпитопами и согласуются с анализом эпитопов, представленным на фиг. 23. В ходе параллельных экспериментов исследовали способность 313R19 или 313M32 конкурировать с 313M34 на наличие связывания с TIGIT. Как показано на фиг. 24B, конкуренция с 313M34 за связывание с hTIGIT ни для антитела 313R19, ни для антитела 313M32 не наблюдалась. Указанные результаты показывают, что 313R19 и 313M32 связываются с эпитопом, отличным от эпитопа, который связывает 313M34. Указанные результаты также согласуются с анализом эпитопов, представленным на фиг. 23.

Пример 19. Продуцирование цитокинов.

Привлечение TIGIT за счет PVR (CD155), экспрессируемого на опухолевых клетках или антигенпрезентирующих клетках, как было показано, понижающе регулирует Т-клеточные эффекторные функции и ингибирует противоопухолевый иммунный ответ (см., например, Joller et al., 2014, Immunity, 40:569-581). Исследовали способность антител против TIGIT 313R19 и 313M32 блокировать PVR-опосредованное ингибирование секреции цитокинов Т-клетками. Активированные бласты Т-клеток человека получали посредством 10-дневного культивирования первичных Т-клеток человека с фитогемагглютинином (ФГА, 2 мкг/мл) и ИЛ-2 (4 нг/мл). Бласты выдерживали в средах, не содержащих ФГА/ИЛ-2, в течение 24 ч, ресуспендировали с плотностью 5×10^5 клетки/мл и обрабатывали контрольным антителом (поликлональный IgG человека, 25 мкг/мл), антителом против TIGIT 313R19 или 313M32 в концентрации 10 или 25 мкг/мл в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем клетки высевали в лунки, которые были покрыты в течение ночи при 4°C антителом против CD3 (Ebioscience), PVR человека-Fc, или антителом против CD3 и hPVR-Fc (все концентрации составляли 10 мкг/м). Через 48 ч собирали бесклеточные культуральные супернатанты и проводили ИФА ELISA на цитокины ИФН-γ и ИЛ-2 (R&D Systems). Результаты выражают в виде уровня продуцирования цитокинов клетками, активированными антителом против CD3 отдельно, при этом уровень антитела против цитокина CD3 принимают за 1,0.

Как видно на фиг. 25, hPVR-Fc не индуцирует продуцирование ни ИФН-γ, ни ИЛ-2 в активирован-

ных клетках. Однако hPVR-Fc выраженно ингибирует продуцирование цитокинов, индуцированное привлечением антитела против CD3. Указанное ингибирование устраняется антителами против TIGIT 313R19 и 313M32, и при более высокой дозе, составляющей 25 мкг/мл, продуцирование ИФН-γ или ИЛ-2 фактически увеличивается по сравнению с количеством, продуцированным антителом против CD3. Активированные Т-клетки экспрессируют и TIGIT, и CD226, оба из которых могут взаимодействовать с PVR, однако взаимодействие TIGIT/PVR является ингибирующим, а взаимодействие CD226/PVR является активирующим. Без связи с конкретной теорией предполагается, что при контакте активированных Т-клеток с PVR взаимодействие TIGIT/PVR "побеждает", поскольку TIGIT связывает PVR с большей силой, чем CD226. Кроме того, на активированных Т-клетках, по-видимому, уровни TIGIT выше, чем уровни CD226, так что общий итог взаимодействия является ингибирующим. Например, на фиг. 25 приведено сравнение антитела против CD3 по отдельности с сочетанием антитела против CD3 и PVR. Блокирование TIGIT антителом 313R19 или 313M32 устраняет опосредованное TIGIT ингибирование, однако теоретически взаимодействие CD226/PVR все же происходит; таким образом, взаимодействие является активирующим. Соответственно, как видно на фиг. 25, при блокировании TIGIT и стимуляции Т-клеток сочетанием антитела против CD3 и PVR уровни ИФН-γ фактически выше, чем при стимуляции антителом против CD3 отдельно.

Указанные результаты демонстрируют, что блокада TIGIT человека антителом против TIGIT может разрешать взаимодействия TIGIT/PVR и восстанавливать продуцирование цитокинов, благоприятное для противоопухолевого ответа.

Пример 20. Анализ антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности.

Антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность (АЗКЦ) относится к киллингу покрытой антителами целевой клетки цитотоксической эффекторной клеткой за счет нефагоцитарного процесса, обычно характеризующегося высвобождением цитотоксических гранул или экспрессией индуцирующих клеточную смерть молекул. Эффекторные клетки, опосредующие АЗКЦ, включают естественные клетки-киллеры (NK), моноциты, макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы и дендритные клетки. Исследовали способность антител против TIGIT 313R19 и 313M32 к опосредованию NK-клеточной АЗКЦ. АЗКЦ тестировали в ходе стандартного 4-часового анализа на высвобождение кальцеина с применением первичных NK-клеток человека в качестве эффекторов и исходных клеток Jurkat или Jurkat-hTIGIT в качестве целевых. NK-клетки человека выделяли непосредственно из свежих образцов лейкотромбоцитарного слоя периферической крови (Stanford Blood Center, Пало-Альто, Калифорния) путем 30-минутной инкубации с коктейлем RosetteSep (Stem Cell Technologies) перед центрифугированием в градиенте плотности фиколла (Ficoll-Hypaque, Sigma). Целевые исходные клетки Jurkat или Jurkat-hTIGIT метили 10 мкМ кальцеином AM (Life Technologies) в течение 1 ч при 37°C, и затем обрабатывали контрольным поликлональным антителом IgG, антителом против TIGIT 313R19 или антителом против TIGIT 313M32 (все в концентрации 10 мкг/мл) в течение 15 мин при комнатной температуре. После инкубации клетки Jurkat или Jurkat-hTIGIT комбинировали с NK-клетками при соотношении эффекторных:целевых клеток, составляющем 20:1, в 96-луночных планшетах с V-образным дном. После 4-часовой инкубации при 37°C собирали бесклеточные супернатанты и количественно определяли высвобождение кальцеина на флуориметре с длиной волны возбуждения, составляющей 485 нм, и длиной волны излучения, составляющей 535 нм. Процент специфического лизиса клеток определяли следующим образом:

$$\% \text{ лизиса}=100\times(ER-SR)/(MR-SR),$$

где ER, SR и MR соответствуют экспериментальному высвобождению, спонтанному высвобождению и максимальному высвобождению кальцеина, соответственно. Спонтанное высвобождение представляет собой флуоресценцию, испускаемую целевыми клетками, инкубированными в средах отдельно (т.е. в отсутствие эффекторных клеток); максимальное высвобождение определяют путем лизиса целевых клеток равным объемом 10% ДСН. Для обеих линий клеток, Jurkat и Jurkat-hTIGIT, процент АЗКЦ определяют как процент специфического лизиса в присутствии экспериментального антитела (313R19 или 313M32) за вычетом процента специфического лизиса в присутствии контрольного антитела.

Как показано на фиг. 26, процент АЗКЦ значимо увеличивался в присутствии антител против TIGIT 313R19 и 313M32 при экспрессии TIGIT целевыми клетками. Способность антител против TIGIT индуцировать АЗКЦ может указывать на наличие нескольких механизмов, за счет которых антитела против TIGIT усиливают иммунный ответ на опухолевые клетки.

Пример 21. Ингибирование роста опухоли in vivo у гуманизированных мышей антителом против TIGIT.

Для исследования эффективности лечения опухоли человека антителом против TIGIT применяли модель на гуманизированных мышах. Гуманизированных мышей получали из Jackson Laboratories. Указанных мышей получают путем инъецирования гематопоэтических стволовых клеток (CD34+ клетки) человека облученным мышам NSG. Через 15 недель подтверждают присутствие зрелых лимфоцитов человека с помощью проточной цитометрии. Каждой мыши инъецировали подкожно происходящие от пациента опухолевые клетки меланомы (OMP-M9, 75000 клеток/мышь). Опухолям позволяли расти в течение 19 дней до достижения среднего объема, составляющего приблизительно 50 мм^3. Мышей-носителей

опухолей рандомизировали в группы (n=8 мышей на группу). Мыши-носители опухолей получали лечение либо контрольным антителом, либо антителом против TIGIT 313R19, либо антителом против TIGIT 313M32. Мышам вводили дозы, составляющие 1 или 5 мг/кг каждые 5 дней. Проводили мониторинг роста опухоли и измеряли объемы опухолей электронным калипером в заданные моменты времени.

Как показано на фиг. 27, рост опухоли был ингибирован у мышей, получавших лечение антителом 313R19 и антителом 313M32, по сравнению с контролем. Эти результаты показывают, что нацеливание на TIGIT эффективно повышает противоопухолевый иммунный ответ лимфоцитов человека и вносит вклад в ингибирование роста опухоли человека in vivo. В указанном эксперименте комбинация антитела против TIGIT 313R19 или 313M32 и антитела против hPD-1 не ингибировала рост опухоли в сколько-либо большей степени, чем антитела против TIGIT при применении в качестве единственных агентов (данные не показаны).

Антитела 313M32 и 313R19, как было обнаружено, ингибируют рост опухоли в контексте лимфоцитов человека, и обладают аналогичной активностью in vivo. Эти результаты продемонстрировали, что гуманизированные модели на мышах-носителях происходящих от пациентов ксенотрансплантатов могут применяться для исследования антитела против TIGIT 313M32 (которое связывает только TIGIT человека) параллельно с доклиническими исследованиями, проводимыми с применением антител против TIGIT 313R12 и 313R19 и моделей опухолей на мышах.

Пример 22. Фармакокинетика антител против TIGIT.

Согласно описанию в настоящем документе антитело против TIGIT 313R12 связывается преимущественно с TIGIT мыши и представляет собой суррогатную молекулу мыши, применяемую в большинстве исследований доклинической эффективности. ФК антитела против TIGIT 313R12 определяли у мышей C57BL-6J при дозах, составляющих 0,1, 1 и 10 мг/кг. Образцы крови отбирали на протяжении 21 дня. Антитело 313R12 демонстрировало нелинейные 2-компартментные характеристики ФК при исследованных уровнях дозы. Считается, что такой зависимый от концентрации клиренс представляет собой типичный признак моноклональных антител, для которых мишень-опосредованный клиренс может представлять собой важный компонент общего механизма элиминации при избытке мишени и ее легкой доступности для лекарственного средства. При дозе 10 мг/кг профиль зависимости концентрации 313R12 от времени приближался к линейному в течение 21 дней, что предполагает насыщение доступных молекул мишени. Оценка конечного времени полужизни в случае нелинейных данных ФК невозможна.

ФК антитела против TIGIT 313R19 определяли у мышей Balb/c. Одну дозу, составляющую 10 мг/кг, вводили каждой мыши внутривенно или внутрибрюшинно. Образцы крови отбирали на протяжении 21 дня. Антитело 313R19 демонстрировало линейные двухкомпартментные ФК-характеристики с типичным для IgG клиренсом. Расчетный период полувыведения в конечной фазе у мышей при дозе 10 мг/кг составлял 7,6 дней.

ФК антитела против TIGIT 313R19 также определяли у яванского макака. Каждое животное получало 4 дозы по 10, 30 и 100 мг/кг дважды в неделю. Каждая группа дозирования включала по 4 самца; исследование прекращали после введения четвертой дозы без периода восстановления. Антитело 313R19 у яванского макака демонстрировало линейные двухкомпартментные характеристики ФК с типичным для IgG клиренсом. Расчетный период полувыведения в конечной фазе у яванского макака составил 15,3 дней.

Определяли фармакокинетику антитела против TIGIT 313M32 у мышей Balb/c. Каждой мыши вводили одну дозу, составляющую 1 или 10 мг/кг внутривенно или 10 мг/кг внутрибрюшинно. Образцы крови отбирали на протяжении 21 дня. Антитело 313M32 у мышей демонстрировало линейные двухкомпартментные характеристики ФК, что согласовалось с фактом отсутствия детектируемого связывания 313M32 с TIGIT мыши. Клиренс был медленным и предварительно продемонстрировал типичное для IgG поведение ФК. Расчетный период полувыведения в конечной фазе у мышей составил 11,7 дней.

Следует понимать, что примеры и варианты реализации, описанные в настоящем документе, приведены исключительно в иллюстративных целях и что специалист в данной области техники может предложить различные модификации или изменения в свете указанных примеров и вариантов, и такие модификации или изменения включены в объем и сущность настоящего изобретения.

Все публикации, патенты, патентные заявки, интернет-сайты и последовательности с номерами доступа/из баз данных, включающие последовательности как полинуклеотидов, так и полипептидов, упоминаемые в настоящем документе, включены в настоящий документ посредством ссылки в настоящем документе полностью и для любых целей в той же степени, как если бы каждая индивидуальная публикация, патент, патентная заявка, интернет-сайт или последовательность с номером доступа/из базы данных были конкретным образом индивидуально перечислены с целью включения посредством ссылки.

Ниже приведены раскрытые в настоящем документе последовательности:

Последовательность аминокислот TIGIT мыши (SEQ ID NO:1)

MHGWLLLVWVQGLIQAAFLATAIGATAGTIDTKRNISAEEGGSVILQCHFSSDTAEVTQV
DWKQQDQLLAIYSVDLGWHVASVFSDRVVPGPSLGLTFQSLTMNDTGEYFCTYHTYPGGI
YKGRIFLKVQESSDDRNGLAQFQTAPLGGTMAAVLGLICLMVTGVTVLARKDKSIRMHSI
ESGLGRTEAEPQEWNLRSLSSPGSPVQTQTAPAGPCGEQAEDDYADPQEYFNVLSYRSLE
SFIAVSKTG

Последовательность аминокислот TIGIT мыши без предсказанной сигнальной последовательности (SEQ ID NO:2)

TIDTKRNISAEEGGSVILQCHFSSDTAEVTQVDWKQQDQLLAIYSVDLGWHVASVFSDRV
VPGPSLGLTFQSLTMNDTGEYFCTYHTYPGGIYKGRIFLKVQESSDDRNGLAQFQTAPLG
GTMAAVLGLICLMVTGVTVLARKDKSIRMHSIESGLGRTEAEPQEWNLRSLSSPGSPVQT
QTAPAGPCGEQAEDDYADPQEYFNVLSYRSLESFIAVSKTG

Последовательность аминокислот внеклеточного домена TIGIT мыши (SEQ ID NO:3)

TIDTKRNISAEEGGSVILQCHFSSDTAEVTQVDWKQQDQLLAIYSVDLGWHVASVFSDRV
VPGPSLGLTFQSLTMNDTGEYFCTYHTYPGGIYKGRIFLKVQESSDDRNGLAQFQTAPLG

Последовательность аминокислот TIGIT человека (SEQ ID NO:4)

MRWCLLLIWAQGLRQAPLASGMMTGTIETTGNISAEKGGSIILQCHLSSTTAQVTQVNWE
QQDQLLAICNADLGWHISPSFKDRVAPGPGLGLTLQSLTVNDTGEYFCIYHTYPDGTYTG
RIFLEVLESSVAEHGARFQIPLLGAMAATLVVICTAVIVVVALTRKKKALRIHSVEGDLR
RKSAGQEEWSPSAPSPPGSCVQAEAAPAGLCGEQRGEDCAELHDYFNVLSYRSLGNCSFF
TETG

Последовательность аминокислот TIGIT человека без предсказанной сигнальной последовательности (SEQ ID NO:5)

MMTGTIETTGNISAEKGGSIILQCHLSSTTAQVTQVNWEQQDQLLAICNADLGWHISPSF
KDRVAPGPGLGLTLQSLTVNDTGEYFCIYHTYPDGTYTGRIFLEVLESSVAEHGARFQIP
LLGAMAATLVVICTAVIVVVALTRKKKALRIHSVEGDLRRKSAGQEEWSPSAPSPPGSCV
QAEAAPAGLCGEQRGEDCAELHDYFNVLSYRSLGNCSFFTETG

Последовательность аминокислот внеклеточного домена TIGIT человека (SEQ ID NO:6)

MMTGTIETTGNISAEKGGSIILQCHLSSTTAQVTQVNWEQQDQLLAICNADLGWHISPSF
KDRVAPGPGLGLTLQSLTVNDTGEYFCIYHTYPDGTYTGRIFLEVLESSVAEHGARFQIP

313R11/313R12 CDR1 тяжелой цепи (SEQ ID NO:7)

GSSLSSSYMS

313R11/313R12/313R14/313R19 CDR2 тяжелой цепи (SEQ ID NO:8)
IIGSNGNTYYANWAKG

313R11/313R12/313R14/313R19 CDR3 тяжелой цепи (SEQ ID NO:9)
GGYRTSGMDP

313R11/313R12 CDR1 легкой цепи (SEQ ID NO:10)
QASQSISSYLNW

313R11/313R12 CDR2 легкой цепи (SEQ ID NO:11)
DALKLAS

313R11/313R12 CDR3 легкой цепи (SEQ ID NO:12)
QQEHSVGNVDN

313R14/313R19 CDR1 тяжелой цепи (SEQ ID NO:13)
GFSLSSSYMS

313R14/313R19 CDR1 легкой цепи вариант1 (SEQ ID NO:14)
QASQSNIYSDLAW

313R14/313R19 CDR2 легкой цепи (SEQ ID NO:15)
RASTLAS

313R14/313R19 CDR3 легкой цепи (SEQ ID NO:16)
QQEHLVAWIYN

313R11/313R12 Последовательность аминокислот вариабельной области тяжелой цепи (SEQ ID NO:17)
QVQLESEGGLFKPTDTLTLTCTVSGSSLSSSYMSWVRQAPGKGLEWIGIIGSNGNTYYAN
WAKGRFTISKTSTTVELKITSPTTEDTATYFCARGGYRTSGMDPWGPGTLVTVSS

313R11/313R12 Последовательность аминокислот вариабельной области легкой цепи (SEQ ID NO:18)

DIVMTQTPASVEVAVGGTVTIKCQASQSISSYLNWYQQKPGQPPKLLIYDALKLASGVPS
RFSGSGSGTEYTLTISGVESADAATYYCQQEHSVGNVDNVFGGGTEVVVKR

313R14 Последовательность аминокислот вариабельной области тяжелой цепи (SEQ ID NO:19)
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSSSYMSWIRQPPGKGLEWIGIIGSNGNTYYA
NWAKGRVTISKTSTTVELKLSSVTAADTAVYYCARGGYRTSGMDPWGQGTLVTVSS

313R14/313R19/313R20 Последовательность аминокислот вариабельной области легкой цепи (SEQ ID NO:20)
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQNIYSDLAWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQEHLVAWIYNVFGQGTKVEIKR

313R11 Последовательность аминокислот тяжелой цепи (mIgG1) с подчеркнутой сигнальной последовательностью (SEQ ID NO:21)
MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLESEGGLFKPTDTLTLTCTVSGSSLSSSYMSWVRQAPG
KGLEWIGIIGSNGNTYYANWAKGRFTISKTSTTVELKITSPTTEDTATYFCARGGYRTSG
MDPWGPGTLVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSL
SSGVHTFPAVLESDLYTLSSSVTVPSSPRPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKP
CICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLTITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQT
QPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVY
TIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMNTNGSYFVYSK
LNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK

313R12 Последовательность аминокислот тяжелой цепи (mIgG2) с подчеркнутой сигнальной последовательностью (SEQ ID NO:22)
MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLESEGGLFKPTDTLTLTCTVSGSSLSSSYMSWVRQAPG
KGLEWIGIIGSNGNTYYANWAKGRFTISKTSTTVELKITSPTTEDTATYFCARGGYRTSG
MDPWGPGTLVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSL
SSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKP
CPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVE
VHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSV
RAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGS

YFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

313R11/313R12 Последовательность аминокислот легкой цепи с подчеркнутой сигнальной последовательностью (SEQ ID NO:23)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSDIVMTQTPASVEVAVGGTVTIKCQASQSISSYLNWYQQKPG
QPPKLLIYDALKLASGVPSRFSGSGSGTEYTLTISGVESADAATYYCQQEHSVGNVDNVF
GGGTEVVVKRTDAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNG
VLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

313R14 Последовательность аминокислот тяжелой цепи (hIgG1) с подчеркнутой сигнальной последовательностью (SEQ ID NO:24)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSSSYMSWIRQPP
GKGLEWIGIIGSNGNTYYANWAKGRVTISKTSTTVELKLSSVTAADTAVYYCARGGYRTS
GMDPWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

313R14/313R19/313R20 Последовательность аминокислот легкой цепи с подчеркнутой сигнальной последовательностью (SEQ ID NO:25)

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQNIYSDLAWYQQKP
GKAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQEHLVAWIYNV
FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

313R11 Последовательность аминокислот тяжелой цепи (mIgG1) без сигнальной последовательности (SEQ ID NO:26)

QVQLESEGGLFKPTDTLTLTCTVSGSSLSSSYMSWVRQAPGKGLEWIGIIGSNGNTYYAN
WAKGRFTISKTSTTVELKITSPTTEDTATYFCARGGYRTSGMDPWGPGTLVTVSSAKTTP
PSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLESDLYTLS

SSVTVPSSPRPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPK
DVLTITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPI
MHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCM
ITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMNTNGSYFVYSKLNVQKSNWEAGNTFTCSVL
HEGLHNHHTEKSLSHSPGK

313R12 Последовательность аминокислот тяжелой цепи (mIgG2) без сигнальной последовательности (SEQ ID NO:27)

QVQLESEGGLFKPTDTLTLTCTVSGSSLSSSYMSWVRQAPGKGLEWIGIIGSNGNTYYAN
WAKGRFTISKTSTTVELKITSPTTEDTATYFCARGGYRTSGMDPWGPGTLVTVSSAKTTA
PSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLS
SSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFI
FPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRV
VSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQ
VTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNS
YSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

313R11/313R12 Последовательность аминокислот легкой цепи без сигнальной последовательности (SEQ ID NO:28)

DIVMTQTPASVEVAVGGTVTIKCQASQSISSYLNWYQQKPGQPPKLLIYDALKLASGVPS
RFSGSGSGTEYTLTISGVESADAATYYCQQEHSVGNVDNVFGGGTEVVVKRTDAAPTVSI
FPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSS
TLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

313R14 Последовательность аминокислот тяжелой цепи (hIgG1) без сигнальной последовательности (SEQ ID NO:29)

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSSSYMSWIRQPPGKGLEWIGIIGSNGNTYYA
NWAKGRVTISKTSTTVELKLSSVTAADTAVYYCARGGYRTSGMDPWGQGTLVTVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR

VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

313R14/313R19/313R20 Последовательность аминокислот легкой цепи без предсказанной сигнальной последовательности (SEQ ID NO:30)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQNIYSDLAWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQEHLVAWIYNVFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS
TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Пептид AH-1 (SEQ ID NO:31)

SPSYVYHQF

313R19/313R20 Последовательность аминокислот вариабельной области тяжелой цепи (SEQ ID NO:32)

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSSSYMSWIRQPPGKGLEWIGIIGSNGNTYYA
NWAKGRVTISKSSNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARGGYRTSGMDPWGQGTLVTVSS

313R19 Последовательность аминокислот тяжелой цепи (IgG1) с подчеркнутой сигнальной последовательностью (SEQ ID NO:33)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSSSYMSWIRQPP
GKGLEWIGIIGSNGNTYYANWAKGRVTISKSSNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARGGYRTS
GMDPWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

313R19 Последовательность аминокислот тяжелой цепи (IgG1) без сигнальной последовательности (SEQ ID NO:34)

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSSSYMSWIRQPPGKGLEWIGIIGSNGNTYYA
NWAKGRVTISKSSNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARGGYRTSGMDPWGQGTLVTVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Линкер (SEQ ID NO:35)
ESGGGGVT

Линкер (SEQ ID NO:36)
LESGGGGVT

Линкер (SEQ ID NO:37)
GRAQVT

Линкер (SEQ ID NO:38)
WRAQVT

Линкер (SEQ ID NO:39)
ARGRAQVT

FLAG-метка (SEQ ID NO:40)
DYKDDDDK

Константная область тяжелой цепи IgG1 человека (SEQ ID NO:41)
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW

QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Константная область тяжелой цепи IgG2 человека (SEQ ID NO:42)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR
VVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Константная область тяжелой цепи IgG3 человека (SEQ ID NO:43)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSC
DTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHE
ALHNRFTQKSLSLSPGK

Константная область тяжелой цепи IgG4 человека (SEQ ID NO:44)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

Fc-область IgG1 человека (версия 13A) (SEQ ID NO:45)

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDKLTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Fc-область IgG1 человека (версия 13B) (SEQ ID NO:46)
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSELTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Fc-область IgG1 человека (версия 13A) (SEQ ID NO:47)
EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDKLTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Fc-область IgG1 человека (версия 13B) (SEQ ID NO:48)
EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PVLDSDGSFFLYSELTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Fc-область IgG2 человека (версия 13A) (SEQ ID NO:49)
CVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQP
REPQVYTLPPSREKMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLKSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Fc-область IgG2 человека (версия 13B) (SEQ ID NO:50)
CVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQP
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGS
FFLYSELTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Fc-область IgG2 человека (версия 13A) (SEQ ID NO:51)
TKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE

VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPI
EKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREKMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPMLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Fc-область IgG2 человека (версия 13A) (SEQ ID NO:52)

TKVDKTVERK**S**CVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPI
EKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREKMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPMLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Fc-область IgG2 человека (версия 13B) (SEQ ID NO:53)
TKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPI
EKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPMLDSDGSFFLYSELTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Fc-область IgG2 человека (версия 13B) (SEQ ID NO:54)

TKVDKTVERK**S**CVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPI
EKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPMLDSDGSFFLYSELTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

313R20 Последовательность аминокислот тяжелой цепи (IgG4) с подчеркнутой сигнальной последовательностью (SEQ ID NO:55)

<u>MKHLWFFLLLVAAPRWVLS</u>QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSSSYMSWIRQPP
GKGLEWIGIIGSNGNTYYANWAKGRVTISKSSNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARGGYRTS
GMDPWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPP
CPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE

PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

313R20 Последовательность аминокислот тяжелой цепи (IgG4) без сигнальной последовательности (SEQ ID NO:56)

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSSSYMSWIRQPPGKGLEWIGIIGSNGNTYYA
NWAKGRVTISKSSNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARGGYRTSGMDPWGQGTLVTVSSASTK
GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

313M26/313M32 CDR1 тяжелой цепи (SEQ ID NO:57)

TSDYAWN

313M26/313M32 CDR2 тяжелой цепи (SEQ ID NO:58)

YISYSGSTSYNPSLRS

313M26/313M32 CDR3 тяжелой цепи (SEQ ID NO:59)

ARRQVGLGFAY

313M26/313M32 CDR1 легкой цепи (SEQ ID NO:60)

KASQDVSTAVA

313M26/313M32 CDR2 легкой цепи (SEQ ID NO:61)

SASYRYT

313M26/313M32 CDR3 легкой цепи (SEQ ID NO:62)

QQHYSTP

313M26 Последовательность аминокислот вариабельной области тяжелой цепи (SEQ ID NO:63)

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWVRQFPGNKLEWMGYISYSGSTSY
NPSLRSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCARRQVGLGFAYWGQGTLVTVSS

313M26 Последовательность аминокислот вариабельной области легкой цепи (SEQ ID NO:64)
DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYTGVPD
RFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSTPWTFG

313M26 Последовательность нуклеотидов вариабельной области тяжелой цепи (SEQ ID NO:65)
GATGTGCAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGAAACCTTCTCAGTCTCTGTCCCTC
ACCTGCACTGTCACTGGCTACTCAATCACCAGTGATTATGCCTGGAACTGGGTCCGGCAG
TTTCCAGGAAACAAACTGGAGTGGATGGGCTACATAAGCTACAGTGGTAGCACTAGCTAC
AACCCATCTCTCAGAAGTCGAATCTCTATCACTCGAGACACATCCAAGAACCAGTTCTTC
CTGCAGTTGAATTCTGTGACTACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAAGGAGACAG
GTCGGGCTGGGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCAGCTCA

313M26 Последовательность нуклеотидов вариабельной области легкой цепи (SEQ ID NO:66)
GACATTGTGATGACCCAGTCTCACAAATTCATGTCCACATCAGTTGGAGACAGGGTCAGC
ATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGAGTACTGCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCA
GGACAATCTCCTAAACTACTGATTTACTCGGCATCCTACCGGTACACTGGAGTCCCTGAT
CGCTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACGGATTTCACTTTCACCATCAGCAGTGTGCAGGCT
GAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAACATTATAGTACTCCGTGGACGTTCGGT

313M32 Последовательность аминокислот вариабельной области тяжелой цепи (SEQ ID NO:67)
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYSITSDYAWNWIRQPPGKGLEWIGYISYSGSTSY
NPSLRSRVTISRDTSKNQFFLKLSSVTAADTAVYYCARRQVGLGFAYWGQGTLVTVSS

313M32 Последовательность аминокислот вариабельной области легкой цепи (SEQ ID NO:68)
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPS
RFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQHYSTPWTFG

313M32 Последовательность аминокислот тяжелой цепи (IgG1) с подчеркнутой предсказанной сигнальной последовательностью (SEQ ID NO:69)

MDWTWRILFLVAAATGAHSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYSITSDYAWNWIRQP
PGKGLEWIGYISYSGSTSYNPSLRSRVTISRDTSKNQFFLKLSSVTAADTAVYYCARRQV
GLGFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

313M32 Последовательность аминокислот тяжелой цепи (IgG1) без сигнальной последовательности (SEQ ID NO:70)

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYSITSDYAWNWIRQPPGKGLEWIGYISYSGSTSY
NPSLRSRVTISRDTSKNQFFLKLSSVTAADTAVYYCARRQVGLGFAYWGQGTLVTVSSAS
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

313M32 Последовательность аминокислот легкой цепи с подчеркнутой предсказанной сигнальной последовательностью (SEQ ID NO:71)

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKP
GKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQHYSTPWTFGQ
GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSTYSLSNTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

313M32 Последовательность аминокислот легкой цепи без сигнальной последовательности (SEQ ID NO:72)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPS
RFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQHYSTPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP

SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSNTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

313M32 Последовательность нуклеотидов вариабельной области тяжелой цепи (SEQ ID NO:73)

CAGGTCCAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCTGAGACCCTGTCCCTC
ACCTGCGCTGTCTCTGGTTACTCCATCACCTCCGATTATGCCTGGAACTGGATTCGGCAG
CCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGTACATAAGCTACTCTGGTAGCACTAGCTAC
AACCCATCTCTCCGGTCACGGGTCACAATATCACGGGACACATCCAAGAACCAGTTCTTC
CTGAAGCTGTCCTCTGTGACCGCCGCTGACACCGCCGTGTATTACTGTGCAAGGAGACAG
GTCGGGCTGGGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCAGCTCA

313M32 Последовательность нуклеотидов вариабельной области легкой цепи (SEQ ID NO:74)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTTGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCAAGGCTTCTCAGGATGTGTCTACTGCTGTTGCCTGGTATCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTACTCTGCATCCTATCGGTACACTGGGGTCCCATCA
AGGTTCTCCGGATCTGGATCTGGGACAGATTTTACTTTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATATTGCAACATATTACTGTCAGCAACATTATTCTACTCCTTGGACATTCGGC

313M32 Последовательность нуклеотидов тяжелой цепи (IgG1) (SEQ ID NO:75)

ATGGACTGGACCTGGAGGATACTCTTTCTCGTGGCTGCAGCCACAGGAGCCCACTCCCAG
GTCCAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCTGAGACCCTGTCCCTCACC
TGCGCTGTCTCTGGTTACTCCATCACCTCCGATTATGCCTGGAACTGGATTCGGCAGCCC
CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGTACATAAGCTACTCTGGTAGCACTAGCTACAAC
CCATCTCTCCGGTCACGGGTCACAATATCACGGGACACATCCAAGAACCAGTTCTTCCTG
AAGCTGTCCTCTGTGACCGCCGCTGACACCGCCGTGTATTACTGTGCAAGGAGACAGGTC
GGGCTGGGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCAGCTCAGCCAGCACA
AAGGGCCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTCCTCCAAGTCCACCTCCGGCGGCACCGCC
GCTCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGTCCTGGAACTCT
GGCGCCCTGACCTCTGGCGTGCACACCTTCCCAGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTAC
TCCCTGTCCTCCGTGGTGACCGTGCCTTCCTCCTCCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGC
AACGTGAACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAGCCTAAGTCCTGC

GACAAGACCCACACCTGCCCTCCCTGCCCTGCCCCTGAGCTGCTGGGCGGACCTTCCGTG
TTCCTGTTCCCTCCTAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTGACC
TGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGATCCTGAGGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGAC
GGCGTGGAGGTGCACAACGCTAAGACCAAGCCAAGGGAGGAGCAGTACAACTCCACCTAC
CGGGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAG
TGCAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCCGCTCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAG
GGCCAGCCTCGCGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCACCCAGCCGGGAGGAGATGACCAAG
AACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAG
TGGGAGTCTAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCTCCTGTGCTGGACTCC
GACGGCTCCTTCTTCCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGC
AACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGC
CTGTCTCTGTCTCCTGGCAAGTGA

313M32 Последовательность нуклеотидов легкой цепи (SEQ ID NO:76)

ATGGTGCTCCAGACCCAGGTCTTCATTTCCCTGCTGCTCTGGATCAGCGGAGCCTACGGG
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTTGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCAAGGCTTCTCAGGATGTGTCTACTGCTGTTGCCTGGTATCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTACTCTGCATCCTATCGGTACACTGGGGTCCCATCA
AGGTTCTCCGGATCTGGATCTGGGACAGATTTTACTTTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCT
GAAGATATTGCAACATATTACTGTCAGCAACATTATTCTACTCCTTGGACATTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCTCCA
TCTGATGAGCAGCTCAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTAT
CCCAGAGAGGCCAAAGTCCAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCCGGCAACTCCCAG
GAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAACACCCTGACA
CTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTATGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGC

CTGTCTTCCCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGCTAA

TIGIT яванского макака (SEQ ID NO:77)

MRWCLFLIWAQGLRQAPLASGMMTGTIETTGNISAKKGGSVILQCHLSSTMAQVTQVNWE
QHDHSLLAIRNAELGWHIYPAFKDRVAPGPGLGLTLQSLTMNDTGEYFCTYHTYPDGTYR

GRIFLEVLESSVAEHSARFQIPLLGAMAMMLVVICIAVIVVVVLARKKKSLRIHSVESGL
QRKSTGQEEQIPSAPSPPGSCVQAEAAPAGLCGEQQGDDCAELHDYFNVLSYRSLGSCSF
FTETG

TIGIT макака-резуса (SEQ ID NO:78)
MRWCLFLIWAQGLRQAPLASGMMTGTIETTGNISAKKGGSVILQCHLSSTMAQVTQVNWE
QHDHSLLAIRNAELGWHIYPAFKDRVAPGPGLGLTLQSLTMNDTGEYFCTYHTYPDGTYR
GRIFLEVLESSVAEHSARFQIPLLGAMAMMLVVICIAVIVVVVLARKKKSLRIHSVESGL
QRKSTGQEEQIPSAPSPPGSCVQAEAAPAGLCGEQQGDDCAELHDYFNVLSYRSLGSCSF
FTETG

Аминокислоты 55–70 TIGIT человека (SEQ ID NO:79)
TQVNWEQQDQLLAICN

Аминокислоты 105–122 TIGIT человека (SEQ ID NO:80)
EYFCIYHTYPDGTYTGRI

313R14/313R19 CDR1 легкой цепи (SEQ ID NO:81)
QASQNIYSDLAW

313M33 Последовательность аминокислот тяжелой цепи (IgG4) без сигнальной последовательности (SEQ ID NO:82)
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYSITSDYAWNWIRQPPGKGLEWIGYISYSGSTSY
NPSLRSRVTISRDTSKNQFFLKLSSVTAADTAVYYCARRQVGLGFAYWGQGTLVTVSSAS
TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

313M33 Последовательность аминокислот тяжелой цепи (IgG4) с сигнальной последовательностью (SEQ ID NO:83)

MDWTWRILFLVAAATGAHSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYSITSDYAWNWIRQP
PGKGLEWIGYISYSGSTSYNPSLRSRVTISRDTSKNQFFLKLSSVTAADTAVYYCARRQV
GLGFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYG
PPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

313M33 Последовательность нуклеотидов тяжелой цепи (IgG4) (SEQ ID NO:84)

ATGGACTGGACCTGGAGGATACTCTTTCTCGTGGCTGCAGCCACAGGAGCCCACTCCCAG
GTCCAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCTGAGACCCTGTCCCTCACC
TGCGCTGTCTCTGGTTACTCCATCACCTCCGATTATGCCTGGAACTGGATTCGGCAGCCC
CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGTACATAAGCTACTCTGGTAGCACTAGCTACAAC
CCATCTCTCCGGTCACGGGTCACAATATCACGGGACACATCCAAGAACCAGTTCTTCCTG
AAGCTGTCCTCTGTGACCGCCGCTGACACCGCCGTGTATTACTGTGCAAGGAGACAGGTC
GGGCTGGGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCAGCTCAGCCAGCACA
AAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCACCCTGCTCCCGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCC
GCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCCGTTACCGTGTCTTGGAACTCC
GGCGCACTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCTGCTGTCCTCCAATCCTCTGGACTCTAC
TCCCTCTCCTCCGTGGTGACAGTGCCCTCCAGCAGCCTGGGCACTAAGACCTACACCTGC
AACGTCGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGA
CCCCCATGCCCACCTTGCCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCCTGTTC
CCCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACTTGCGTGGTG
GTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTATGTGGATGGCGTGGAG
GTTCATAATGCCAAGACAAAGCCTCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACCTACCGGGTGGTC
AGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAAGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTC
TCCAACAAAGGGCTCCCATCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCC
CGGGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAAGAGGAGATGACCAAGAACCAAGTG
TCCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC
AATGGGCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACTCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCC
TTCTTCCTCTACTCCCGGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGCAATGTCTTC
TCCTGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTG
TCTCTGGGCAAATGA

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело, специфически связывающее внеклеточный домен TIGIT, которое содержит: CDR1 тяжелой цепи, содержащий TSDYAWN (SEQ ID NO: 57), CDR2 тяжелой цепи, содержащий YISYSGSTSYNPSLRS (SEQ ID NO: 58), и CDR3 тяжелой цепи, содержащий ARRQVGLGFAY (SEQ ID NO: 59), и CDR1 легкой цепи, содержащий KASQDVSTAVA (SEQ ID NO: 60), CDR2 легкой цепи, содержащий SASYRYT (SEQ ID NO: 61), и CDR3 легкой цепи, содержащий QQHYSTP (SEQ ID NO: 62).

2. Антитело по п.1, которое содержит вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности SEQ ID NO: 67, и вариабельную область легкой цепи, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности SEQ ID NO: 68.

3. Антитело по п.1, которое содержит вариабельную область тяжелой цепи, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности SEQ ID NO: 63, и вариабельную область легкой цепи, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности SEQ ID NO: 64.

4. Антитело по любому из пп.1-3, которое представляет собой моноклональное антитело.

5. Антитело по п.1, которое содержит последовательность аминокислот тяжелой цепи SEQ ID NO:

70 и последовательность аминокислот легкой цепи SEQ ID NO: 72.

6. Антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, кодируемую плазмидой, депонированной в Американской коллекции типовых культур (ATCC) под номером PTA-122346, и вариабельную область легкой цепи, кодируемую плазмидой, депонированной в ATCC под номером PTA-122347, причем указанное антитело специфически связывает внеклеточный домен TIGIT.

7. Антитело по любому из пп.1-6, которое связывает TIGIT человека, но не связывает:

(a) TIGIT мыши;

(b) TIGIT крысы;

(c) TIGIT яванского макака; и/или

(d) TIGIT макака-резуса.

8. Антитело по любому из пп.1-7, которое:

(a) ингибирует связывание TIGIT с рецептором полиовируса (PVR);

(b) ингибирует или блокирует взаимодействие TIGIT и PVR;

(c) ингибирует сигнализацию TIGIT;

(d) ингибирует активацию TIGIT;

(e) ингибирует фосфорилирование TIGIT; и/или

(f) снижает экспрессию TIGIT на поверхности клеток.

9. Антитело по любому из пп.1-8, которое индуцирует и/или усиливает иммунный ответ.

10. Антитело по п.9, характеризующееся тем, что указанный иммунный ответ направлен на опухоль или опухолевую клетку.

11. Антитело по любому из пп.1-7, которое:

(a) повышает клеточный иммунитет;

(b) повышает Т-клеточную активность;

(c) повышает цитолитическую Т-клеточную (CTL) активность;

(d) повышает активность естественных клеток-киллеров (NK);

(e) повышает продуцирование ИЛ-2 и/или число продуцирующих ИЛ-2 клеток;

(f) повышает продуцирование ИФН-γ и/или число продуцирующих ИФН-γ клеток;

(g) повышает иммунный ответ Th1-типа;

(h) снижает продуцирование ИЛ-4 и/или число продуцирующих ИЛ-4 клеток;

(i) снижает продуцирование ИЛ-10 и/или число продуцирующих ИЛ-10 клеток;

(j) снижает иммунный ответ Th2-типа;

(k) ингибирует и/или снижает супрессорную активность регуляторных Т-клеток (Treg); и/или

(l) ингибирует и/или снижает супрессорную активность супрессорных клеток миелоидного происхождения (СКМП).

12. Антитело по любому из пп.1-3, которое представляет собой гуманизированное антитело.

13. Антитело по любому из пп.1-3, которое представляет собой антитело человека.

14. Антитело по любому из пп.1-3, которое представляет собой химерное антитело.

15. Антитело по любому из пп.1-3, которое представляет собой антитело IgG1.

16. Антитело по любому из пп.1-3, которое представляет собой антитело IgG2.

17. Антитело по любому из пп.1-3, которое представляет собой антитело IgG4.

18. Гетеродимерный агент, содержащий антитело по любому из пп.1-11.

19. Биспецифический агент, содержащий:

a) первое плечо, которое специфически связывает TIGIT; и

b) второе плечо,

при этом указанное первое плечо содержит антитело по любому из пп.1-11.

20. Биспецифический агент по п.19, характеризующийся тем, что указанное второе плечо содержит антигенсвязывающий сайт из антитела.

21. Фармацевтическая композиция для индукции, стимуляции, повышения или увеличения продолжительности иммунного ответа у субъекта, содержащая антитело по любому из пп.1-11, гетеродимерный агент по п.18 или биспецифический агент по п.19 или 20 и фармацевтически приемлемый носитель.

22. Выделенная молекула полинуклеотида, содержащая полинуклеотид, который кодирует антитело по любому из пп.1-11.

23. Выделенный полинуклеотид, кодирующий полипептид, специфически связывающий внеклеточный домен TIGIT, содержащий полинуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75 и SEQ ID NO: 76.

24. Вектор, содержащий полинуклеотид по п.22 или 23.

25. Клетка, содержащая полинуклеотид по п.22 или 23 или вектор по п.24.

26. Способ индукции, стимуляции, повышения или увеличения продолжительности иммунного ответа у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества антител по любому из пп.1-11, гетеродимерного агента по п.18 или биспецифического агента по п.19 или 20.

27. Способ ингибирования роста опухоли у субъекта, характеризующийся тем, что указанный спо-

соб включает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества антитела по любому из пп.1-11, гетеродимерного агента по п.18 или биспецифического агента по п.19 или 20.

28. Способ по п.27, характеризующийся тем, что указанная опухоль выбрана из группы, состоящей из опухоли ободочной и прямой кишки, опухоли яичника, опухоли поджелудочной железы, опухоли легкого, опухоли печени, опухоли молочной железы, опухоли почки, опухоли предстательной железы, опухоли желудочно-кишечного тракта, меланомы, опухоли шейки матки, опухоли мочевого пузыря, глиобластомы и опухоли головы и шеи.

29. Способ лечения рака у субъекта, характеризующийся тем, что указанный способ включает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества антитела по любому из пп.1-11, гетеродимерного агента по п.18 или биспецифического агента по п.19 или 20.

30. Способ по п.29, характеризующийся тем, что указанный рак выбран из группы, состоящей из рака ободочной и прямой кишки, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака легкого, рака печени, рака молочной железы, рака почки, рака предстательной железы, рака желудочно-кишечного тракта, меланомы, рака шейки матки, рака мочевого пузыря, глиобластомы и рака головы и шеи.

31. Способ по любому из пп.26-30, который дополнительно включает введение по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента субъекту, где указанный дополнительный терапевтический агент представляет собой иммунотерапевтический агент, выбранный из группы, состоящей из гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМКСФ), макрофагального колониестимулирующего фактора (МКСФ), гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (ГКСФ), интерлейкина 2 (ИЛ-2), интерлейкина 3 (ИЛ-3), интерлейкина 12 (ИЛ-12), интерлейкина 15 (ИЛ-15), B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), лиганда 4-1BB, GITRL, лиганда OX-40 (OX-40L), антитела против PD-1, антитела против PD-L1, антитела против CTLA4, антитела против LAG-3, антитела против CD3, антитела против GITR, антитела против OX-40 и антитела против TIM-3.

32. Плазмида, депонированная в ATCC с присвоенным номером PTA-122346.

33. Плазмида, депонированная в ATCC с присвоенным номером PTA-122347.

34. Фармацевтическая композиция для ингибирования роста опухоли у субъекта, содержащая антитело по любому из пп.1-11, гетеродимерный агент по п.18 или биспецифический агент по п.19 или 20 и фармацевтически приемлемый носитель.

35. Фармацевтическая композиция для лечения рака у субъекта, содержащая антитело по любому из пп.1-11, гетеродимерный агент по п.18 или биспецифический агент по п.19 или 20 и фармацевтически приемлемый носитель.

Фиг. 1

Фиг. 2

Фиг. 3

Фиг. 4

Фиг. 5

Фиг. 6

Фиг. 7

CT26.WT
Объем опухоли, мм³
500
400
300
200
100
0
0
5
10
15
20
25
Дни после инъекции
Контрольный IgG2
313R12
313R13

Фиг. 8

A
ИФН-гамма
TOD (x 1000)
Контрольное антитело
313R12
B
ИЛ-2
TOD (x 1000)
Контрольное антитело
313R12
C
ИЛ-4
TOD (x 1000)
Контрольное антитело
313R12
D
ИЛ-10
TOD (x 1000)
Контрольное антитело
313R12
Без пептида
Пептид АН-1

Фиг. 9

Мишени CT26.WT
Процент специфического лизиса
50
40
30
20
10
0
-0
-20
E:T 25:1
E:T 50:1
Контрольное антитело
313R12

Фиг. 10

CD4+ Т-клетки
Процент супрессии
40
30
20
10
0
1:0.5
CD8+ Т-клетки
Процент супрессии
40
30
20
10
0
1:0.5
Контрольное антитело
313R12

Фиг. 11

A
%CD3e Т-клеток (от живых клеток)
60
50
40
30
20
10
0
Контрольное антитело
313R12
B
%CD4 Т-клеток (от живых клеток)
50
40
30
20
10
0
Контрольное антитело
313R12
C
%CD8 Т-клеток (от живых клеток)
12
10
8
6
4
2
0
Контрольное антитело
313R12
D
%CD4 Т-клеток центральной памяти (от CD4 Т)
100
80
60
40
20
0
Контрольное антитело
313R12
E
%CD8 Т-клеток центральной памяти (от CD8 Т)
100
80
60
40
20
0
Контрольное антитело
313R12

Фиг. 12

A
Общее содержание положительных по TIGIT клеток
% положительных по TIGIT клеток (от живых клеток)
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
Контрольное антитело
313R12
B
Клетки Treg
% FoxP3+ (от CD4)
30
25
20
15
10
5
0
Контрольное антитело
313R12
C
Положительные по TIGIT Treg
% положительных по TIGIT клеток (от Treg)
20
16
12
8
4
0
Контрольное антитело
313R12
D
Отрицательные по TIGIT Treg
% отрицательных по TIGIT клеток (от Treg)
100
80
60
40
20
0
Контрольное антитело
313R12

Фиг. 13

A
Миелоидные клетки
% CD11b (от живых клеток)
10
8
6
4
2
0
Контрольное антитело
313R12
B
СКМП
% СКМП (от CD11b+)
70
60
50
40
30
20
10
0
Контрольное антитело
313R12
C
ГСКМП
% ГСКМП (от CD11b+)
70
60
50
40
30
20
10
0
Контрольное антитело
313R12
D
МСКМП
% МСКМП (от CD11b+)
20
16
12
8
4
0
Контрольное антитело
313R12

Фиг. 14

Клетки Renca
Объем опухоли, мм³
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
Дни после имплантации
Контрольное антитело
313R12

Фиг. 15

Объем опухоли, мм³
750
500
250
0
Контрольное антитело
0,5
1
3
5
10
15
30
313R12 (мг/кг)

Фиг. 16

A
Контрольное антитело
B
Клетки CT26.WT
313R12
C
Антитело против PD-L1
D
313R12 + антитело против PD-L1
Объем опухоли, мм³
4000
3000
2000
1000
0
0
20
40
60
80
Дни после имплантации

Клетки CT26.WT
E
Объем опухоли, мм³
Дни после имплантации
Контрольное антитело
313R12
Антитело против PD-L1
313R12 + антитело против PD-L1
F
Процент выживания
Дни после лечения
Контрольное антитело
313R12
Антитело против PD-L1
313R12 + антитело против PD-L1

Фиг. 17

Клетки CT26.WT
A
Контрольное антитело
B
313R12
C
Антитело против PD-L1
D
313R12 + антитело против PD-L1
Объем опухоли, мм³
Дни после имплантации

E

Фиг. 18

Фиг. 19A

Фиг. 19B

Фиг. 20

```
TIGIT человека        MRWCLLLIWAQGLRQAPLASGMMTGTIETTGNISAEKGGSIILQCHLSSTTAQVTQVNWE
TIGIT яванского макака -----F----------------------------K----V---------M---------
TIGIT макака-резуса    -----F----------------------------K----V---------M---------

TIGIT человека        QQDQ-LLAICNADLGWHISPSFKDRVAPGPGLGLTLQSLTVNDTGEYFCIYHTYPDGTYT
TIGIT яванского макака -H-HS----R--E-----Y-A-------------------M--------T---------R
TIGIT макака-резуса    -H-HS----R--E-----Y-A-------------------M--------T---------R

TIGIT человека        GRIFLEVLESSVAEHGARFQIPLLGAMAATLVVICTAVIVVVALTRKKKALRIHSVEGDL
TIGIT яванского макака ---------------S------------MM-----I------V-A----S-------SG-
TIGIT макака-резуса    ---------------S------------MM-----I------V-A----S-------SG-

TIGIT человека        RRKSAGQEEWSPSAPSPPGSCVQAEAAPAGLCGEQRGEDCAELHDYFNVLSYRSLGNCSFFTETG
TIGIT яванского макака Q---T----QI------------------------Q-D------------------S--------
TIGIT макака-резуса    Q---T----QI------------------------Q-D------------------S--------

TIGIT человека        SEQ ID NO:4
TIGIT яванского макака SEQ ID NO:77
TIGIT макака-резуса    SEQ ID NO:78
```

Фиг. 21

Фиг. 22

PVR
TIGIT
Эпитоп 313M32
Эпитоп 313M34
TM

Фиг. 23

A
313R19 (hFc)
313M26 (mFc)
ФЭ-конъюгированное антитело против Fc человека
TIGIT-GFP
B
313M34 (mFc)
313R19 (hFc)
ФЭ-конъюгированное антитело против Fc мыши
313M32 (hFc)
Объем опухоли, мм³
TIGIT-GFP

Фиг. 24

Фиг. 25

Фиг. 26

Фиг. 27