

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040773**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.07.26

(21) Номер заявки
201990505

(22) Дата подачи заявки
2017.08.17

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) АНТИ-TIGIT АНТИТЕЛА, АНТИ-PVRIG АНТИТЕЛА И ИХ КОМБИНАЦИИ

(31) 62/376,334; 62/376,335; 62/417,217;
62/477,974; 62/513,771; 62/513,916;
62/513,775; 62/538,561

(32) 2016.08.17; 2016.08.17; 2016.11.03;
2017.03.28; 2017.06.01; 2017.06.01;
2017.06.01; 2017.07.28

(33) US

(43) 2019.09.30

(86) PCT/IB2017/001256

(87) WO 2018/033798 2018.02.22

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
КОМПЬЮДЖЕН ЛТД. (IL)

(72) Изобретатель:
**Уайт Марк, Кумар Сандип, Чань
Кристофер, Лян Спенсер, Стэплтон
Лэнс, Дрейк Эндрю, В., Гозлан Еси,
Вакнин Илан, Самеа-Гринвальд
Ширли, Дасса Лиат, Тиран Зохар,
Коджокару Гэд., С., Котгури Майа,
Чэн Хсин-Юань, Хансен Кайл, Гилад
Давид, Нисим, Сафьон Эйнав, Офир
Эран, Преста Леонард, Теолис Ричард,
Десай Радика, Уолл Патрик (IL)**

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(56) WO-A1-2016028656
WO-A2-2015009856
US-A1-2016176963

JOSHUA D. NOSANCHUK: "The interdependence of antibody C and V regions on specificity and affinity : Significant implications for the engineering of therapeutic antibodies", VIRULENCE, vol. 4, no. 6, 15 August 2013 (2013-08-15), pages 439-440, XP055436928, US ISSN: 2150-5594, DOI: 10.4161/viru.26153, page 439, left-hand column, paragraph 3 - right-hand column, paragraph 1

ALENA JANDA ET AL.: "Ig Constant Region Effects on Variable Region Structure and Function", FRONTIERS IN MICROBIOLOGY, vol. 7, 4 February 2016 (2016-02-04), XP055436953, DOI: 10.3389/fmicb.2016.00022, page 4; table 1

WO-A2-2016134335
WO-A1-2016134333
WO-A1-2017059095
WO-A2-2016191643

(57) Предложены композиция для применения при лечении рака путем активации Т-клеток и/или NK-клеток, содержащая антигенсвязывающий домен, который связывается с TIGIT человека, в частности анти-TIGIT антитело, способ получения такого антитела и клетка-хозяин, используемая в указанном способе. Также предложены композиции нуклеиновых кислот и векторов для применения при лечении рака путем активации Т-клеток и/или NK-клеток и способ лечения рака путем активации Т-клеток.

040773

B1

B1

040773

I. Родственные заявки

Данная заявка заявляет приоритет по заявке на патент США № 62/376334, поданной 17 августа 2016 г., заявке на патент США № 62/513771, поданной 1 июня 2017 г., заявке на патент США № 62/376335, поданной 17 августа 2016, заявке на патент США № 62/417217, поданной 3 ноября 2016 г., заявке на патент США № 62/513775, поданной 1 июня 2017 г., заявке на патент США № 62/477974, поданной 28 марта 2017 г., заявке на патент США № 62/513916, поданной 1 июня 2017 г., и заявке на патент США № 62/538561, поданной 28 июля 2017 г., все из которых включены в данное описание посредством ссылки в полном объеме.

Перечень последовательностей

В данную заявку включен перечень последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и полностью включен в данное описание посредством ссылки. Указанная копия ASCII, созданная 17 августа 2017 г., называется 114386-5008-WO_SL.txt и имеет размер 590436 байт.

II. Уровень техники

Наивные Т-клетки должны получать два независимых сигнала от антигенпрезентирующих клеток (АПК), чтобы стать продуктивно активированными. Первый, сигнал 1, является антигенспецифичным и появляется, когда Т-клеточные рецепторы для распознавания антигенов встречаются с соответствующим комплексом антиген-ГКГС на АПК. Путь иммунного ответа определяется вторым антигеннезависимым сигналом (сигнал 2), который доставляется через костимулирующую молекулу Т-клеток, которая взаимодействует с ее APC-экспрессированным лигандом. Этот второй сигнал может быть или стимулирующим (позитивная костимуляция), или ингибирующим (отрицательная костимуляция или коингибирование). В отсутствие костимулирующего сигнала или при наличии коингибирующего сигнала активация Т-клеток нарушается или прерывается, что может привести к состоянию антигенспецифической нереспонзивности (известной как Т-клеточная анергия) или может привести к Т-клеточной апоптотической гибели.

Пары костимулирующих молекул обычно состоят из лигандов, экспрессируемых на АПК и их родственных рецепторов, экспрессируемых на Т-клетках. Прототипными лиганд-рецепторными парами костимулирующих молекул являются B7/CD28 и CD40/CD40L. Семейство B7 состоит из связанных структурно белковых лигандов клеточной поверхности, которые могут обеспечивать стимулирующий или ингибирующий вклад в иммунный ответ. Члены семейства B7 структурно связаны с внеклеточным доменом, содержащим по меньшей мере один вариабельный или константный домен иммуноглобулина.

Как положительные, так и отрицательные костимулирующие сигналы играют критическую роль в регуляции клеточных иммунных ответов, и молекулы, которые опосредуют эти сигналы, оказались эффективными мишенями для иммуномодуляции. Основываясь на этих знаниях, было разработано несколько терапевтических подходов, которые включают нацеливание на костимулирующие молекулы, и было показано, что они полезны для профилактики и лечения рака путем включения или предотвращения выключения иммунных ответов у больных раком, и для профилактики и лечения аутоиммунных заболеваний и воспалительных заболеваний, а также отторжения при аллогенной трансплантации, каждый из которых отключает неконтролируемые иммунные ответы или путем индукции "сигнала выключения" отрицательной костимуляцией (или коингибирования) у субъектов с этими патологическими состояниями.

Манипуляция сигналами, полученными лигандами B7, продемонстрировала потенциал в лечении аутоиммунных заболеваний, воспалительных заболеваний и отторжения трансплантата. Терапевтические стратегии включают блокирование костимуляции с использованием моноклональных антител к лиганду или к рецептору костимулирующей пары или с использованием растворимых слитых белков, состоящих из костимулирующего рецептора, который может связывать и блокировать соответствующий лиганд. Другим подходом является индукция коингибирования с использованием растворимого слитого белка ингибиторного лиганда. Эти подходы полагаются, по меньшей мере частично, на возможное удаление ауто- или аллореактивных Т-клеток (которые ответственны за патогенные процессы при аутоиммунных заболеваниях или трансплантации соответственно), по-видимому, потому что в отсутствие костимуляции (которая индуцирует гены выживания клеток) Т-клетки становятся очень восприимчивыми к индукции апоптоза. Таким образом, новые агенты, способные модулировать костимулирующие сигналы, не ставя под угрозу способность иммунной системы защищать от возбудителей, являются весьма выгодными для лечения и профилактики таких патологических состояний.

Костимулирующие пути играют важную роль в развитии опухолей. Интересно, что опухоли, как было показано, ускользают от иммунного лизиса, препятствуя активации Т-клеток путем ингибирования костимулирующих факторов в семействах B7-CD28 и ФНО, а также путем привлечения регуляторных Т-клеток, которые ингибируют противоопухолевые Т-клеточные ответы (см. Wang (2006), "Immune Suppression by Tumor Specific CD4⁺ Regulatory T cells in Cancer", *Semin. Cancer Biol.* 16:73-79; Greenwald, et al. (2005), "The B7 Family Revisited", *Ann. Rev. Immunol.* 23:515-48; Watts (2005), "TNF/TNFR Family Members in Co-stimulation of T Cell Responses", *Ann. IRev. Immunol.* 23:23-68; Sadum, et al., (2007) "Immune Signatures of Murine and Human Cancers Reveal Unique Mechanisms of Tumor Escape and New Targets for Cancer Immunotherapy", *Clin. Canc. Res.* 13(13): 4016-4025). Такие опухолевые экспрессируемые кос-

тимулирующие молекулы стали привлекательными раковыми биомаркерами и могут служить опухоле-ассоциированными антигенами (ТАА). Кроме того, костимулирующие пути были идентифицированы как иммунологические контрольные точки, которые ослабляют Т-клеточно-зависимые иммунные ответы как на уровне инициации, так и на уровне эффекторной функции в опухолевых метастазах. Поскольку разработанные противораковые вакцины продолжают улучшаться, становится ясно, что такие иммунологические контрольные точки являются серьезным препятствием для способности вакцин индуцировать терапевтические противоопухолевые ответы. В этом отношении костимулирующие молекулы могут служить адъювантами для активной (вакцинации) и пассивной (антитело-опосредованной) иммунотерапии рака, обеспечивая стратегии для предотвращения иммунной толерантности и стимуляции иммунной системы.

За последнее десятилетие были разработаны агонисты и/или антагонисты различных костимулирующих белков для лечения аутоиммунных заболеваний, отторжения трансплантата, аллергии и рака. Например, CTLA4-Ig (абатацепт, Oregenia®) одобрен для лечения РА (ревматоидный артрит), мутированный CTLA4-Ig (белатацепт, Nulojix®) для предупреждения острого отторжения трансплантата почки и при помощи анти-CTLA4 антитела (ипилидумаб, Yervoy®), недавно одобренного для лечения меланомы. Были одобрены другие регуляторы костимуляции, такие как анти-PD-1 антитела Merck (Keytruda®) и BMS (Opdivo®), были одобрены для лечения рака и находятся в тестировании на вирусные инфекции.

Однако, несмотря на то, что монотерапия с использованием антител против ингибитора контрольных точек доказана, ряд исследований (Ahmadzadeh et al., Blood 114:1537 (2009), Matsuzaki et al., PNAS 107(17): 7875-7880 (2010), Fourcade et al., Cancer Res. 72(4):887-896 (2012) и Gros et al., J. Clinical Invest. 124(5):2246 (2014), которые изучали инфильтрирующие опухоли лимфоциты (TIL), продемонстрировали, что TIL обычно экспрессируют множество рецепторов контрольных точек. Более того, вполне вероятно, что TIL, которые экспрессируют несколько контрольных точек, на самом деле являются наиболее опухоле-реактивными. Напротив, неопухолевые реактивные Т-клетки на периферии более склонны экспрессировать одну контрольную точку. Блокада контрольных точек с использованием моноспецифических полноразмерных антител, вероятно, является недискриминационной в отношении дерепрессии опухоле-реактивных TIL, по сравнению с аутоантиген-реактивными одиночными экспрессирующими Т-клетками, которые, как предполагается, способствуют аутоиммунной токсичности.

Одной из представляющих интерес мишеней является PVRIG. PVRIG, также называемый связанный с рецептором полиовируса белок, содержащий иммуноглобулиновый домен, Q6DKI7 или C7orf15, представляет собой трансмембранный доменный белок длиной 326 аминокислот с сигнальным пептидом (простирающийся от аминокислоты 1 до 40), внеклеточный домен (простирающийся от аминокислоты 41 до 171), трансмембранный домен (простирающийся от аминокислоты 172 до 190) и цитоплазматический домен (простирающийся от аминокислоты 191 до 326). PVRIG связывается с белком 2, связанным с рецептором вируса полиомиелита, (PVL2, также известным как нектин-2, CD112 или медиатор входа вируса герпеса В (HVEB), человеческий гликопротеин цитоплазматической мембраны), партнером по связыванию PVRIG.

Другой представляющей интерес мишенью является TIGIT. TIGIT является коингибиторным рецептором, который экспрессируется на высоком уровне на эффекторных и регуляторных (Treg) CD4 + Т-клетках, эффекторных CD8 + Т-клетках и NK-клетках. Было показано, что TIGIT ослабляет иммунный ответ путем (1) прямого сигналинга, (2) индуцирования сигналинга лиганда и (3) конкуренции с нарушением сигналинга с помощью костимулирующего рецептора CD226 (также известного как DNAM-1). Сигналинг TIGIT был наиболее хорошо изученным в NK-клетках, где было показано, что взаимодействие с его родственным лигандом, рецептором вируса полиомиелита (PVR, также известен как CD155), непосредственно подавляет цитотоксичность NK-клеток через их цитоплазматический домен ITIM (иммунорецепторный тирозинный ингибирующий мотив). Показано, что нокаут гена TIGIT или блокада антителами взаимодействия TIGIT/PVR увеличивает гибель NK-клеток *in vitro*, а также усугубляет аутоиммунные заболевания *in vivo*. Помимо прямого воздействия на Т- и NK-клетки, TIGIT может индуцировать PVR-опосредованный сигналинг в дендритных или опухолевых клетках, что приводит к увеличению продуцирования противовоспалительных цитокинов, таких как ИЛ-10. В Т-клетках TIGIT может также ингибировать ответы лимфоцитов, нарушая гомодимеризацию костимулирующего рецептора CD226 и конкурируя с ним за связывание с PVR.

TIGIT экспрессируется на высоком уровне на лимфоцитах, включая инфильтрирующие опухоли лимфоциты (TIL) и Treg, которые проникают в различные типы опухолей. PVR также широко экспрессируется в опухолях, что указывает на то, что сигнальная ось TIGIT-PVR может быть главным механизмом ускользания от иммунологического надзора для рака. Примечательно, что экспрессия TIGIT тесно коррелирует с экспрессией другого важного коингибиторного рецептора PD1. TIGIT и PD1 совместно экспрессируются на TIL многочисленных опухолей человека и мыши. В отличие от TIGIT и CTLA4 PD1 ингибирование Т-клеточных ответов не связано с конкуренцией за связывание лиганда с костимулирующим рецептором.

Соответственно TIGIT является привлекательной мишенью для терапии моноклональными антите-

лами и, кроме того, в комбинации с дополнительными антителами, включая анти-PVRIG антитела.

III. Краткое описание сущности изобретения

Соответственно, в одном аспекте изобретение относится к композициям, содержащим антигенсвязывающий домен, который связывается с человеческим TIGIT (SEQ ID NO: 97), содержащим вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 160, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 165. Кроме того, антигенсвязывающий домен содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 150, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 155. Кроме того, антигенсвязывающий домен содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 560, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 565.

В следующем аспекте изобретение относится к композиции, содержащей антитела, содержащие тяжелую цепь, содержащую VH-CH1-шарнир-CH2-CH3, причем указанный VH содержит SEQ ID NO: 160, и легкую цепь, содержащую VL-VC, причем указанный VL, содержащий SEQ ID NO: 165, и VC является или каппа, или лямбда. Кроме того, антитело может содержать тяжелую цепь, содержащую VH-CH1-шарнир-CH2-CH3, причем VH содержит SEQ ID NO: 150; и легкую цепь, содержащую VL-VC, причем указанный VL, содержащий SEQ ID NO: 159, и VC является или каппа, или лямбда. Кроме того, антитело может содержать тяжелую цепь, содержащую VH-CH1-шарнир-CH2-CH3, причем VH содержит SEQ ID NO: 560; и легкую цепь, содержащую VL-VC, причем указанный VL, содержащий SEQ ID NO: 565, и VC является или каппа, или лямбда.

В некоторых аспектах последовательность CH1-шарнир-CH2-CH3 выбирается из человеческого IgG1, IgG2 и IgG4 и их вариантов. В некоторых аспектах тяжелая цепь имеет SEQ ID NO: 164 и легкая цепь имеет SEQ ID NO: 169.

В дополнительном аспекте композиции могут дополнительно содержать второе антитело, которое связывается с белком рецептора контрольной точки человека, который может представлять собой человеческий PD-1 или человеческий PVRIG. Второе антитело может содержать антигенсвязывающий домен, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 5, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 10, или тяжелую цепь, имеющую SEQ ID NO: 9, и легкую цепь, имеющую SEQ ID NO: 14.

В следующем аспекте изобретение относится к композициям нуклеиновых кислот, включающим первую нуклеиновую кислоту, кодирующую вариабельный тяжелый домен, содержащий SEQ ID NO: 160, и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую вариабельный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 165. Альтернативно, композиции нуклеиновых кислот содержат первую нуклеиновую кислоту, кодирующую вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 150, и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую вариабельный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 155. Альтернативно, композиции нуклеиновых кислот содержат первую нуклеиновую кислоту, кодирующую вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 560, и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую вариабельный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 565.

В дополнительном аспекте изобретение относится к композициям векторов экспрессии, содержащим данные композиции нуклеиновой кислоты, также как, например, первый вектор экспрессии, содержащий первую нуклеиновую кислоту, и второй вектор экспрессии, содержащий вторую нуклеиновую кислоту, или, альтернативно, вектор экспрессии, который содержит как первую, так и вторую нуклеиновые кислоты.

В дополнительном аспекте изобретение относится к клеткам-хозяевам, содержащим композиции вектора экспрессии, и способам получения антител, включающим культивирование клеток-хозяев в условиях, в которых антитела продуцируются, и выделение антитела.

В дополнительном аспекте изобретение относится к анти-PVRIG антителам, содержащим тяжелую цепь, имеющую SEQ ID NO: 9, и легкую цепь, имеющую SEQ ID NO: 14. Изобретение также относится к антителам, имеющим тяжелую цепь, имеющую SEQ ID NO: 19; и легкую цепь, имеющую SEQ ID NO: 24.

В дополнительном аспекте анти-PVRIG антитело (или CHA.7.518.1.H4 (S241P), или CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) совместно вводится со вторым антителом, которое связывается с рецепторным белком контрольной точки человека, таким как антитело, которое связывает PD-1.

В дополнительном аспекте анти-PVRIG антитело (или CHA.7.518.1.H4 (S241P), или CHA.7.538.1.2.H4 (S241P)) вводят совместно со вторым антителом, которое связывается с рецепторным белком контрольной точки человека, таким как антитело, которое связывает человеческий TIGIT, такой как CPA.9.086 или CPA.9.083, или CHA.9.547.13.

В дополнительном аспекте изобретение относится к композициям нуклеиновых кислот, содержащим первую нуклеиновую кислоту, кодирующую тяжелую цепь или CHA.7.518.1.H4 (S241P), или CHA.7.538.1.2.H4 (S241P)), и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую легкую цепь или CHA.7.518.1.H4 (S241P), или CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) соответственно.

В дополнительном аспекте изобретение относится к композициям векторов экспрессии, содержащим данные композиции нуклеиновой кислоты, также как, например, первый вектор экспрессии, содержащий первую нуклеиновую кислоту, и второй вектор экспрессии, содержащий вторую нуклеиновую

кислоту, или, альтернативно, вектор экспрессии, который содержит как первую, так и вторую нуклеиновые кислоты.

В дополнительном аспекте изобретение относится к клеткам-хозяевам, содержащим композиции векторов экспрессии, и способам получения антител, включающим культивирование клеток-хозяев в условиях, в которых антитела продуцируются, и выделение антитела.

В другом аспекте изобретение относится к способам, включающим: а) обеспечение популяции клеток из образца опухоли у пациента; б) окрашивание указанной популяции мечеными антителами, которые связывают: i) белок TIGIT; ii) белок PVR; iii) белок PD-1; iv) белок PD-L1 и v) изотипический контроль; с) выполнение анализа сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS); d) для каждого из TIGIT, PVR, PD-1 и PD-L1, определяя процент клеток в указанной популяции, которые экспрессируют белок относительно указанного изотипического контрольного антитела; причем если процент положительных клеток составляет $\geq 1\%$ для всех 4 рецепторов, е) введение антител к TIGIT и PD-1 указанному пациенту.

В другом аспекте изобретение относится к способам, включающим: а) обеспечение популяции клеток из образца опухоли у пациента; б) окрашивание указанной популяции мечеными антителами, которые связывают: i) белок PVRIG; ii) белок PVRL2; iii) белок PD-1; iv) белок PD-L1 и v) изотипический контроль; с) метод анализа сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS); d) для каждого из PVRIG, PVRL2, PD-1 и PD-L1, определяя процент клеток в указанной популяции, которые экспрессируют белок относительно указанного изотипического контрольного антитела; причем если процент положительных клеток составляет $\geq 1\%$ для всех 4 рецепторов, е) введение антител к PVRIG и PD-1 указанному пациенту.

В другом аспекте изобретение относится к способам, включающим: а) обеспечение популяции клеток из образца опухоли у пациента; б) окрашивание указанной популяции мечеными антителами, которые связывают: i) белок PVRIG; ii) белок PVRL2; iii) белок TIGIT; iv) белок PVR и v) изотипический контроль; с) выполнение анализа с помощью проточной цитометрии (FACS); d) для каждого из PVRIG, PVRL2, TIGIT и PVR, определяя процент клеток в указанной популяции, которые экспрессируют белок относительно указанного изотипического контрольного антитела; причем если процент положительных клеток составляет $\geq 1\%$ для всех 4 рецепторов, е) введение антител к PVRIG и TIGIT указанному пациенту.

IV. Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 изображена полноразмерная последовательность человеческого PVRIG (демонстрирующая две разные точки начала метионина). Сигнальный пептид подчеркнут, ВКД подчеркнут дважды.

На фиг. 2 изображена последовательность белка 2, связанного с человеческим рецептором вируса полиомиелита, (PVLR2, также известного как нектин-2, CD112 или медиатор входа вируса герпеса В (HVEB)), партнера по связыванию для PVRIG. PVLR2 является человеческим гликопротеином цитоплазматической мембраны.

На фиг. 3А и В изображены переменные тяжелые и легкие цепи, а также последовательности vHCDR1, vHCDR2, vHCDR3, vLCDR1, vLCDR2 и vLCDR3 каждого из перечисленных антител СНА согласно изобретению, СНА.7.518.1.H4(S241P), и СНА7.538.1.2.H4(S241P).

На фиг. 4А и В антитела к PVRIG увеличивают пролиферацию Т-клеток в СКЛ (смешанная культура лимфоцитов). Процентное содержание клеток с низким уровнем CFSE (карбоксифлуоресцеин сукцинимидиловый эфир) изображено в СКЛ-реакции, обработанных указанными антителами к PVRIG. Каждый график представляет собой одного отдельного донора CD3 Т-клеток. Эксперименты описаны в примере 23 USSN 15/048967, включенном в данный документ посредством ссылки.

На фиг. 5 А и В характеристики связывания гибридных антител к PVRIG с модифицированными клеточными линиями HEK hPVRIG, исходными клетками HEK и клетками Jurkat. HEK OE обозначает клетки HEK hPVRIG, HEK rag обозначает исходные клетки HEK. Для данных Jurkat gMFI_r указывает на кратную разницу в геометрической СИФ окрашивания антител к PVRIG относительно их контролей. Концентрация указывает на то, при какой gMFI_r была рассчитана. Отсутствие связывания указывает на то, что антитело не связывается с исследуемой клеточной линией. Выделенные антитела представляют собой "лучшие четыре" антитела, представляющие интерес.

Фиг. 6А и В. Характеристики связывания гибридных антител к PVRIG с первичными МКПК человека, сверхэкспрессирующими клетками яванского макака и первичными МКПК яванского макака. Ehpri sup OE обозначает клетки ehpri, временно трансфицированные cPVRIG, ehpri rag обозначает исходные клетки ehpri. gMFI_r указывает на кратную разницу в геометрической СИФ окрашивания антител к PVRIG относительно их контролей. Концентрации указывают на то, при какой была рассчитана gMFI_r. Не протестированные указывает на антитела, которые не были протестированы в связи с отсутствием связывания с HEK hKVRIG человека, клетками ehpri cPVRIG или не отвечали требованиям связывания с субпопуляциями МКПК. Выделенные антитела представляют собой "лучшие четыре" антитела, представляющие интерес. Эксперименты описаны в примере 21 USSN 15/048967, включенном в данный документ посредством ссылки.

Фиг. 7А и В. Сводные данные по блокирующей способности антител к PVRIG в конкурентном анализе на основе проточной цитометрии. Показана ИК₅₀ ингибирования. Ни одна ИК₅₀ не указывает на то, что эти антитела являются неблокирующими. Выделенные антитела представляют собой "лучшие четыре" антитела, представляющие интерес. Эксперименты описаны в примере 21 USSN 15/048967 включенном в данный документ посредством ссылки.

На фиг. 8А и В TIL были совместно культивированы с клетками меланомы 624 при 1: 1 Е: Т в течение 18 ч в присутствии анти-PVRIG Ат (CPA.7.021; 10 мкг/мл) анти-TIGIT (10А7 клон, 10 мкг/мл) или в комбинации. Супернатант собирали и тестировали в цитометрическом мультиплексном анализе Th1/Th2/Th17 (Cytometric Bead Array) для определения секретируемых цитокинов. Уровни ИФН-γ (А) и ФНО (В) измеряли. Обработки сравнивали при помощи t-критерия Стьюдента (* P ≤ 0,05, ** P ≤ 0,01) из трех образцов.

На фиг. 9 от А до F TIL MART-1 или 209 были совместно культивированы с клетками меланомы 624 при 1:1 Е:Т в течение 18 ч в присутствии анти-PVRIG Ат (CPA.7.021, 10 мкг/мл), анти-DNAM1 (клон DX11, BD Biosciences кат. № 559787; 10 мкг/мл) или в комбинации. Супернатант собирали и тестировали в цитометрическом мультиплексном анализе Th1/Th2/ Th17 (Cytometric Bead Array) для определения секретируемых цитокинов. Уровни ИФН-γ (А, D) и ФНО (В, Е) измеряли. TIL окрашивали на поверхностную экспрессию CD 137 (С, F).

На фиг. 10А и В TIL (F4) были совместно культивированы с клетками меланомы 624 при 1: 3 Е: Т в течение 18 ч в присутствии анти-PVRIG Ат (CPA.7.021, 10 мкг/мл) анти-TIGIT (клон 10А7, 10 мкг/мл), анти-PD1 (мкАт 1B8, Merck, 10 мкг/мл) или в комбинации. Супернатант собирали и тестировали в цитометрическом мультиплексном анализе Th1/Th2/ Th17 (Cytometric Bead Array) для определения секретируемых цитокинов. Уровни ИФН-γ (А) и ФНО (В) измеряли.

На фиг. 11 от А до Е изображены четыре гуманизированные последовательности для каждого из СНА.7.518, СНА.7.524, СНА.7.530, СНА.7.538_1 и СНА.7.538_2. Все гуманизированные антитела содержат замену Н4(S241Р). Следует отметить, что легкая цепь для СНА.7.538_2 такая же, как для СНА.7.538_1. "Н1" каждого представляет собой "замену CDR" без изменений в человеческой каркасной области. Последующие последовательности, определяющие изменения в каркасной области, выделены жирным шрифтом. Последовательности CDR выделены жирным шрифтом. Определения CDR представляют собой AbM с веб-сайта www.bioinf.org.uk/abs/. Зародышевая линия человека и последовательности слияния от IMGT®, международной информационной системы ImMunoGeneTics® www.imgt.org (основатель и директор: Мари-Пауле Лефранк, Монпелье, Франция). Нумерация остатков изображена как последовательная (seq) или согласно Chothia с сайта www.bioinf.org.uk/abs/ (AbM). "b" обозначена скрытая боковая цепь; "p" обозначена частично скрытая; "i" обозначена боковая цепь на границе раздела между доменами VH и VL. Различия в последовательности между зародышевыми линиями человека и мыши отмечены звездочкой (*). Потенциальные дополнительные мутации в структурах отмечены ниже последовательности. Потенциальные изменения в последовательностях CDR, отмеченные ниже каждой последовательности CDR, как отмечено на фигуре (# замены дезамидирование: Q/S/A, это может предотвратить дезамидирование аспарагина (N). @ замены окисление триптофана: Y/F/H; они могут предотвращать окисление триптофана; @ замены окисление метионина: L/F/A).

На фиг. 12 от А до Е изображено сопоставление гуманизированных последовательностей трех антител СНА: СНА.7.518, СНА.7.538.1 и СНА.7.538.2.

На фиг. 13 изображены схемы для комбинирования гуманизированных VH и VL антител к СНА. "ChimVH" и "chimVL" представляют собой вариативные тяжелые и легкие последовательности мыши, присоединенные к константной области человеческого IgG.

Фиг. 14. Характеристика связывания гибридомных антител к PVRIG с первичными МКПК человека, сверхэкспрессирующими клетками яванского макака и первичными МКПК яванского макака. Ехр1 супо ОЕ обозначает клетки ехр1, временно трансфицированные сPVRIG, ехр1 раг обозначает исходные клетки ехр1. gMFIg указывает на кратную разницу в геометрической СИФ окрашивания антител к PVRIG относительно их контролей. Концентрации указывают на то, при какой gMFIg была рассчитана. Не тестировалось указывает на антитела, которые не были протестированы в связи с отсутствием связывания с НЕК hKVRIG человека, клетками ехр1 сPVRIG или не отвечали требованиям связывания с субпопуляциями МКПК. Выделенные антитела представляют собой четыре антитела, для которых была выполнена гуманизация (см. фиг. 24). Эксперименты описаны в примере 21 USSN 15/048967 включенном в данный документ посредством ссылки.

Фиг. 15. Сводные данные по блокирующей способности антител к PVRIG в конкурентном анализе на основе проточной цитометрии. Изображена ИК₅₀ ингибирования. Ни одна ИК₅₀ не указывает на то, что эти антитела являются неблокирующими. Выделенные антитела представляют собой четыре антитела для которых была выполнена гуманизация (см. фиг. 24).

Фиг. 16. Сводные активности выбранных антител к PVRIG в анализах цитотоксичности NK-клеток против клеток Reh и MOLM-13. Кратное изменение цитотоксичности по сравнению с контролем рассчитывали путем деления абсолютного уровня гибели (%) с использованием антитела к PVRIG на абсолют-

ный уровень гибели (%) с использованием контрольного антитела. Кратное изменение рассчитывается исходя из соотношения эффектор-мишень 5:1.

Фиг. 17. Выравнивание последовательностей ортологов PVRIG. Выровненные последовательности внеклеточного домена PVRIG человека, яванского макака, игрушки и макаки-резуса. Различия между последовательностями человека и яванского макака выделяются желтым цветом.

Фиг. 18. Связывание антител против PVRIG человека с вариантами PVRIG яванского макака, человека, гибридными вариантами яванского макака/человека. Изображено связывание антител с PVRIG (●) яванского макака дикого типа, PVRIG яванского макака H61R (■), PVRIG яванского макака P67S (▲), супо PVRIG яванского макака L95R/T97I (▼) и PVRIG человека дикого типа (◆). Сигналы ИФА изображаются в зависимости от концентрации антител.

Фиг. 19. Корреляция группы эпитопов и перекрестной реактивности антител против человеческого PVRIG с яванским макаком.

Фиг. 20 от А до В. (А) Специфичность CHA.7.518.1.H4(S241P) по отношению к клеткам HEK, модифицированным для сверхэкспрессии PVRIG, и исходным клеткам HEK. Данные демонстрируют абсолютные геометрические значения СИФ (гСИФ) в зависимости от увеличения концентрации антител. (В) Специфичность CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) в отношении клеток HEK, модифицированных для сверхэкспрессии PVRIG, и исходных клеток HEK. Данные демонстрируют абсолютные геометрические значения СИФ (гСИФ) в зависимости от увеличения концентрации антител.

На фиг. 21 А-В изображена способность CHA.7.518.1.H4 (S241P) (А) и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) (В) связывать клетки Jurkat, которые эндогенно экспрессируют PVRIG подтвержденный экспрессией РНК. (А) Связывание CHA.7.518.1.H4 (S241P) с клетками Jurkat. Данные демонстрируют абсолютные геометрические значения СИФ (гСИФ) в зависимости от увеличения концентрации антител. Окрашивание изотипа изображено как отрицательный контроль. (В) Связывание CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) с клетками Jurkat. Данные демонстрируют абсолютные геометрические значения СИФ (гСИФ) в зависимости от увеличения концентрации антител. Окрашивание изотипа изображено как отрицательный контроль. Оба антитела способны связывать клетки Jurkat с сопоставимой аффинностью с клетками HEK hPVRIG.

На фиг. 22 изображена способность CHA.7.518.1.H4 (S241P) и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) связывать Т-клетки CD8, которые были количественно размножены путем воздействия пептида ЦМВ (494- 503, NLVPMVATV), и которые эндогенно экспрессируют PVRIG, подтвержденный экспрессией РНК. Связывание CHA.7.518.1.H4 (S241P) и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) с CD8 Т-клетками, количественно размноженными пептидом ЦМВ. Данные демонстрируют абсолютные геометрические значения СИФ (гСИФ) в зависимости от увеличения концентрации антител. Окрашивание изотипа изображено как отрицательный контроль.

Фиг. 23А-В. (А) Специфичность CHA.7.518.1.H4 (S241P) по отношению к клеткам ехрі, модифицированным для сверхэкспрессии PVRIG яванского макака, и исходным клеткам ехрі. Данные демонстрируют абсолютные геометрические значения СИФ (гСИФ) в зависимости от увеличения концентрации антител. Специфичность CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) по отношению к клеткам ехрі, модифицированным для сверхэкспрессии PVRIG яванского макака, и исходным клеткам ехрі. Данные демонстрируют измерения абсолютных геометрических значений СИФ (гСИФ) в зависимости от увеличения концентрации антител.

Фиг. 24А-В. (А) Блокирование PVRIG Fc в клетках HEK посредством CHA.7.518.1.H4(S241P) и CHA.7.538.1.2.H4(S241P). Данные демонстрируют процентное соотношение PVRIG Fc с клетками HEK в зависимости от увеличения концентрации антител по сравнению с максимальным сигналом, индуцированным PVRIG Fc, и только вторичным фоном. (В) Влияние CHA.7.544 на связывание PVRIG Fc с клетками HEK. Данные демонстрируют абсолютную гСИФ, полученную из связывания PVRIG Fc с клетками HEK при возрастающих концентрациях CHA.7.544. Количество связывания PVRIG Fc было обнаружено с помощью антимишного Fc, вторично конъюгированного с Alexa 647.

Фиг. 25А-В. (А) Блокирование PVRL2 Fc с клетками HEK hPVRIG с помощью CHA.7.518.1.H4 (S241P), CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) и CHA.7.530.3. Данные демонстрируют процент связывания PVRL2 Fc с клетками HEK hPVRIG в зависимости от увеличения концентрации антител по сравнению с максимальным сигналом, индуцированным PVRL2 Fc, и только вторичным фоном. (В) Влияние CHA.7.544 на связывание PVRL2 Fc с клетками HEK hPVRIG. Данные демонстрируют процент связывания PVRL2 Fc с клетками HEK hPVRIG в зависимости от увеличения концентрации антител по сравнению с максимальным сигналом, индуцированным PVRL2 Fc, и вторичного антитела в качестве фона.

Фиг. 26. Изображен процент связывания Alexa 647-конъюгированного CHA.7.518.1.H4 (S241P) и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) по сравнению с их максимальным сигналом при предварительной инкубации клеток Jurkat с неконъюгированным CHA.7.518.1.H4 (S241P), CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) и изотопическим контролем.

Фиг. 27А-В. А) Гуманизированные антитела к PVRIG, CHA.7.518.1.H4 (S241P) и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P), увеличивают пролиферацию CD4 + Т-клеток. Репрезентативные данные (n≥2) демонстрируют процентное содержание пролиферирующих CD4 + Т-клеток с низким уровнем CFSE (среднее плюс стан-

дартное отклонение) от одного донора человеческих CD4⁺ Т-клеток при совместном культивировании с клетками CHO-S OKT3 hPVRL2 в присутствии анти-DNAM-1 антитела или различных анти-PVRIG антител или изотипических контролей IgG. Пунктирная линия указывает на исходный процент CD4⁺ Т-клеток с низким уровнем CFSE, пролиферирующих после лечения изотипическим контрольным антителом IgG4 человека. Числа относятся к процентному увеличению или уменьшению пролиферации в результате лечения анти-PVRIG или анти-DNAM-1 антителами, соответственно, по сравнению с соответствующими изотипическими контрольными антителами. (В) Гуманизированные антитела к PVRIG, CHA.7.518.1.H4 (S241P) и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P), увеличивают пролиферацию CD4⁺ Т-клеток в зависимости от hPVRL2. Репрезентативные данные ($n \geq 2$) демонстрируют процентное содержание пролиферирующих CD4⁺ Т-клеток с низким уровнем CFSE (среднее плюс стандартное отклонение) от одного донора человеческих CD4⁺ Т-клеток в ответ на совместное культивирование с CHO-S OKT3 исходными или CHO-S OKT3 hPVRL2 клетками в присутствии анти-DNAM-1 антитела или различных анти-PVRIG антител, или изотипических контролей IgG. Пунктирная линия указывает на исходный процент CD4⁺ Т-клеток с низким уровнем CFSE, пролиферирующих после лечения изотипическими антителами или IgG4 человека, или IgG1 мыши. Числа относятся к процентному увеличению или уменьшению пролиферации в результате лечения анти-PVRIG или анти-DNAM-1 антителами, соответственно, по сравнению с соответствующими изотипическими контрольными антителами.

Фиг. 28А-С. (А) Гуманизированные антитела к PVRIG, CHA.7.518.1.H4 (S241P) и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P), увеличивают пролиферацию CD8⁺ Т-клеток. Репрезентативные данные ($n \geq 2$) демонстрируют процентное содержание пролиферирующих CD8⁺ Т-клеток с низким уровнем CFSE (среднее плюс стандартное отклонение) от одного донора (донор 232) человеческих CD8⁺ Т-клеток при совместном культивировании с клетками CHO-S OKT3 hPVRL2 в присутствии анти-DNAM-1 антитела или различных анти-PVRIG антител, или изотипических контролей IgG. Пунктирная линия указывает на исходный процент CD8⁺ Т-клеток с низким уровнем CFSE, пролиферирующих после лечения изотипическими антителами IgG1 мыши или IgG4 человека. Числа относятся к процентному увеличению или уменьшению пролиферации в результате лечения анти-PVRIG или анти-DNAM-1 антителами, соответственно, по сравнению с соответствующими изотипическими контрольными антителами. (В) Гуманизированные антитела к PVRIG, CHA.7.518.1.H4 (S241P) и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P), увеличивают пролиферацию CD8⁺ Т-клеток. Репрезентативные данные ($n \geq 2$) демонстрируют процентное содержание пролиферирующих CD8⁺ Т-клеток с низким уровнем CFSE (среднее плюс стандартное отклонение) от одного донора (донор 234) человеческих CD8⁺ Т-клеток при совместном культивировании с клетками CHO-S OKT3 hPVRL2 в присутствии анти-DNAM-1 антитела или различных анти-PVRIG антител или изотипических контролей IgG. Пунктирная линия указывает на исходный процент CD8⁺ Т-клеток с низким уровнем CFSE, пролиферирующих после лечения изотипическими антителами IgG1 мыши или IgG4 человека. Числа относятся к процентному увеличению или уменьшению пролиферации в результате лечения анти-PVRIG или анти-DNAM-1 антителами, соответственно, по сравнению с соответствующими изотипическими контрольными антителами. (С) Гуманизированные антитела к PVRIG, CHA.7.518.1.H4 (S241P) и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P), увеличивают секрецию ИФН- γ из CD8⁺ Т-клеток. Репрезентативные данные ($n \geq 2$) демонстрируют пг/мл ИФН- γ , продуцируемого (среднее плюс стандартное отклонение) тремя разными донорами человеческих CD8⁺ Т-клеток (доноры 231, 232 и 234) при совместном культивировании с клетками CHO-S OKT3 hPVRL2 в присутствии анти-DNAM-1 антитела или различных анти-PVRIG антител, или изотипических контролей IgG. Пунктирная линия указывает на исходную продукцию ИФН- γ после лечения изотипическим антителом IgG4 человека. Числа относятся к процентному увеличению в секреции ИФН- γ после лечения анти-PVRIG антителами по сравнению с изотипическим контролем IgG4.

Фиг. 29. Гуманизированные антитела к PVRIG, CHA.7.518.1.H4 (S241P) и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P), последовательно увеличивают пролиферацию CD4⁺ Т-клетку множества доноров, тогда как CHA.7.530.3 и CHA.7.544 этого не делают. Процент пролиферации по сравнению с изотипическим контролем рассчитывали путем деления процента CD4⁺ Т-клеток с низким уровнем CFSE после лечения антителом к PVRIG на процент после лечения изотипическим антителом для каждого донора. Процент пролиферации для лечения изотипическим антителом устанавливали на ноль. Каждый символ на графике представляет другого донора.

Фиг. 30А-Д. (А) Дозозависимый эффект гуманизированных антител к PVRIG, CHA.7.518.1.H4(S241P) и CHA.7.538.1.2.H4(S241P), на пролиферацию CD4⁺ Т-клеток. Репрезентативные данные ($n \geq 2$) с двумя различными донорами-людьми демонстрируют средний процент пролиферирующих CD4⁺ Т-клеток после изменения дозы с 66 нМ до 0,726 нМ с помощью изотипа IgG4 человека, антител CHA.7.518.1.H4(S241P) или CHA.7.538.1.2.H4(S241P). Расчетная ЭК50 находится в пределах одной цифры в нМ диапазоне. (В) Дозозависимый эффект гуманизированных антител к PVRIG, CHA.7.518.1.H4 (S241P) и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P), на пролиферацию CD8⁺ Т-клеток. Репрезентативные данные ($n \geq 2$) с двумя различными донорами-людьми демонстрируют средний процент пролиферирующих CD8⁺ Т-клеток после изменения дозы от 66 нМ до 0,264 нМ с помощью изотипа IgG4 человека, антител CHA.7.518.1.H4(S241P), CHA.7.38.1.2, или CHA.7.544. Расчетная ЭК50 находится в пределах одной циф-

ры в нМ диапазоне.

Фиг. 31А-С. (А) Анализ методом проточной цитометрии экспрессии TIGIT и PVRIG на TIL и PVR, экспрессии PVRL2 на клеточной линии меланомы 624. Значения представляют собой отношение средней интенсивности флуоресценции (СИФ) и изотипического контроля. (В-С) Репрезентативный эксперимент, демонстрирующий секрецию ИФН- γ (В) и ФНО (С) при помощи TIL при совместном культивировании с клетками меланомы 624 при 1: 3 Е: Т в течение 18 ч в присутствии изотипического контроля, анти-TIGIT (30 мкг/мл) или анти-PVRIG Ат (10 мкг/мл) в виде монотерапии (синие гистограммы) или в комбинации с анти-TIGIT (зеленые гистограммы). Процент эффекта монотерапии Ат сравнивали с терапией изотипом mIgG1, а процент эффекта комбинированной терапии Ат сравнивали с монотерапией анти-TIGIT.

Фиг. 32А-Н. TIL (209-gp100/463-F4-gp100) совместно культивировали с клетками меланомы 624 в 1: 3 Е: Т в течение 18 ч в присутствии анти-PVRIG Ат CHA7.518.1.H4 (S241P) или CHA.7.538 с или без анти-TIGIT (aTIGIT) в комбинации и исследовали на секрецию цитокинов. Процент эффекта терапии Ат сравнивали с терапией изотипическим контролем, и было отражено на графике среднее из 5 экспериментов (F4) или 6 экспериментов (209). Для каждого лечения был рассчитан двусторонний парный критерий Стьюдента по сравнению с изотипом или в комбинации по сравнению с только анти-TIGIT, р-значения указаны.

Фиг. 33А-В. (А) Гуманизированное антитело к PVRIG, CHA.7.518.1.H4 (S241P) и анти-TIGIT антитело увеличивает пролиферацию CD4⁺ Т-клеток по сравнению с лечением одним антителом. Репрезентативные данные ($n \geq 2$) демонстрируют процентное содержание пролиферирующих CD4⁺ Т-клеток с низким уровнем CFSE (среднее плюс стандартное отклонение) от одного донора (донор 143) человеческих CD3⁺ Т-клеток при совместном культивировании с клетками CHO-S OKT3 hPVRL2. Пунктирная линия указывает на исходный процент CD4⁺ Т-клеток с низким уровнем CFSE, пролиферирующих после лечения изотипическим контрольным антителом IgG4 человека. (В) Гуманизированное антитело к PVRIG, CHA.7.518.1.H4 (S241P), и анти-TIGIT антитело увеличивает пролиферацию CD4⁺ Т-клеток по сравнению с лечением одним антителом. Репрезентативные данные ($n \geq 2$) демонстрируют процентное содержание пролиферирующих CD4⁺ Т-клеток с низким уровнем CFSE (среднее плюс стандартное отклонение) от одного донора (донор 201) человеческих CD4⁺ Т-клеток при совместном культивировании с клетками CHO-S OKT3 hPVRL2. Пунктирная линия указывает на исходный процент CD4⁺ Т-клеток с низким уровнем CFSE, пролиферирующих после лечения изотипическим контрольным антителом IgG4 человека. Числа относятся к процентному увеличению или уменьшению пролиферации в результате лечения анти-PVRIG или анти-DNAM-1 антителами, соответственно, по сравнению с соответствующими изотипическими контрольными антителами.

Фиг. 34А-В. (А): Комбинация гуманизированного антитела к PVRIG, CHA.7.518.1.H4 (S241P) и анти-TIGIT антитела увеличивает пролиферацию CD8⁺ Т-клеток. Репрезентативные данные ($n \geq 2$) демонстрируют процентное содержание пролиферирующих CD8⁺ Т-клеток с низким уровнем CFSE (среднее плюс стандартное отклонение) от репрезентативного донора (донор 232) человеческих CD8⁺ Т-клеток при совместном культивировании с клетками CHO-S OKT3 hPVRL2. Пунктирная линия указывает на исходный процент CD8⁺ Т-клеток с низким уровнем CFSE, пролиферирующих после лечения человеческим изотипическим антителом IgG4. Числа относятся к процентному увеличению или уменьшению пролиферации в результате лечения анти-PVRIG или анти-DNAM-1 антителами, соответственно, по сравнению с соответствующими изотипическими контрольными антителами. (В) Комбинация гуманизированного антитела к PVRIG, CHA.7.518.1.H4 (S241P) и анти-TIGIT антитела увеличивает секрецию ИФН- γ из CD8⁺ Т-клеток. Репрезентативные данные ($n \geq 2$) демонстрируют пг/мл ИФН- γ , продуцируемого (среднее плюс стандартное отклонение) репрезентативным донором человеческих CD8⁺ Т-клеток (донор 232) при совместном культивировании с клетками CHO-S OKT3 hPVRL2. Пунктирная линия указывает на исходную продукцию ИФН- γ после лечения изотипическим антителом IgG4 человека. Числа относятся к процентному увеличению или уменьшению в секреции ИФН- γ в результате лечения анти-PVRIG или анти-DNAM-1 антителами, соответственно, по сравнению с соответствующими изотипическими контрольными антителами.

На фиг. 35 изображена схема экспериментальной системы примера 2(3).

На фиг. 36А-С изображена гистограмма с изображением уровней экспрессии PVRIG (с использованием анти-PVRIG человека CHA.7.538.AF647), TIGIT (с использованием анти-TIGIT человека, кат. 17-9500-41 eBioscience) и DNAM-1 (с использованием античеловеческого CD226-APC, кат. 338312 Biolegend) в TIL. Кратное изменение экспрессии сравнивается с изотипическим (Iso) контролем.

Фиг. 37. Обобщенный график влияния анти-PVRIG антител на секрецию ИФН- γ из TIL. TIL были совместно культивированы с клетками CHO-S HLA-A2/B2M, сверхэкспрессирующими PVRL2, в соотношении Е: Т 1: 3 в течение 18 ч в присутствии анти-PVRIG антител (c518, c538 и 544) или с анти-TIGIT антителом. Каждая точка представляет собой среднее значение данных секреции ИФН- γ из одного и того же TIL из разных экспериментов. Указанный процент отличается от каждого лечения антителом по сравнению с изотипическим контролем. Для каждого лечения был рассчитан двусторонний парный критерий Стьюдента по сравнению с 544 или в комбинации по сравнению с только анти-TIGIT, р-значения указаны.

ны. Количество экспериментов, определенных заранее на каждый TIL; 209 (N = 3), F4 (N = 2), F5 (N = 3) и MART1 (N = 2).

Фиг. 38. Обобщенный график влияния C518 и c538 в зависимости от дозы на секрецию ФНО- α от TIL. TIL были совместно культивированы с клетками CHO-S HLA-A2/B2M, сверхэкспрессирующими PVRL2, в соотношении эффектор-мишень 1:3 в течение 18 ч в присутствии анти-PVRIG антител (c518, c538 или изотипический контроль), как описано в примере 2(3).

Фиг. 39А-С. TIL были совместно культивированы с целевыми клетками CHO-S HLA-A2/B2M, сверхэкспрессирующими PVRL2, в соотношении E:T 1:3 в течение 18 ч в присутствии анти-PVRIG антител (c518, c538 и 544) или с анти-TIGIT антителом. Процент, указанный в приведенных выше таблицах, представляет собой разницу во влиянии на секрецию цитокинов из TIL каждого лечения антителом по сравнению с его изотипическим контролем. Первый эксперимент представлен на фиг. А и В, а второй эксперимент - на фиг. С.

Фиг. 40. Метод анализа совместного культивирования CHO-S ОКТ3. CFSE-меченые CD3+ Т-клетки были совместно культивированы с CHO-S-ОКТ3-PVRL2 или ложно-трансфицированными клетками в течение 5 суток. Был проанализировано влияние анти-PVRIG Ат на пролиферацию Т-клеток и секрецию цитокинов.

Фиг. 41. Влияние анти-PVRIG антител на секрецию ИФН- γ на клетки CHO-ОКТ3 PVRL2 у донора, ответившего на лечение, против донора, не ответившего на лечение. CD3+ клетки из 2 разных доноров были совместно культивированы с клетками CHO-S-PVRL2 в 5:1 E:T в течение 5 суток в присутствии анти-PVRIG Ат и исследовались на секрецию цитокинов и пролиферацию Т-клеток. (А) "Донор, ответивший на лечение", для которого мы наблюдали эффект для анти-PVRIG Ат. (В) "Донор, не ответивший на лечение", для которого мы не наблюдали эффектов для лечения Ат.

Фиг. 42. Влияние анти-PVRIG антител на пролиферацию CD4 и CD8 у донора, ответившего на лечение. CFSE-меченые CD3+ Т-клетки были совместно культивированы с клетками CHO-S-PVRL2 в 5:1 E:T в течение 5 суток в присутствии анти-PVRIG Ат или анти-TIGIT Ат. Влияние на пролиферацию Т-клеток, гейтированных по CD4 или CD8, оценивали с помощью проточной цитометрии. Представлены проценты пролиферирующих клеток (низкий уровень CFSE) (А) или общего количества клеток, (В) CD4+ с низким уровнем CFSE или CD8+ с низким уровнем CFSE.

Фиг. 43. Изображено влияние анти-PVRIG антител на секрецию ИФН- γ или пролиферацию CD8 у донора, ответившего на лечение. CD3+ клетки были совместно культивированы с клетками CHO-S-PVRL2 при 5:1 E:T в течение 5 суток в присутствии анти-PVRIG Ат и исследовались на (А) секрецию цитокинов и (В) пролиферацию Т-клеток. Процент эффекта терапии Ат сравнивали с терапией изотипическим контролем, и было представлено среднее число 5 доноров, ответивших на лечение, (пациентов, ответивших на лечение). (С) Уровни ИФН- γ от тех же 5 доноров при совместном культивировании с CHOS-ОКТ3 PVRL2, как описано в разделах А и В, при лечении изотипом по сравнению с анти-PVRIG Ат. Р-значение представляет собой отношение двустороннего критерия Стьюдента.

На фиг. 44 представлена сводная таблица эффекта лечения Ат для исследуемых доноров (n = 10). Указанные проценты представляют собой эффект лечения Ат при конкретном показании (указано в названиях столбцов) по сравнению с соответствующим изотипическим контролем, доноры, ответившие на лечение, (доноры № 3, 72226345 и ES_001), которые считаются "пациентами, ответившими на лечение", для которых некоторые анти-PVRIG Ат (в основном CHA. 7.518) увеличивают ИФН- γ или пролиферацию против изотипического контроля.

На фиг. 45А-В изображены результаты экспериментов с несколькими антителами. Аффинности (nM) изображены в А, причем клетки HEK hPVRIG являются клетками HEK, трансформированными hPVRIG, как обсуждалось в данном документе, и клетками Jurkat, экспрессирующие эндогенный hPVRIG. На (В) изображена гСИФ с использованием 4 различных антител против первичных CD8 Т-клеток донора 1 и (С), первичных CD8-Т-клеток донора 2.

На фиг. 46А-В изображены взаимодействия TIGIT с клетками CHO. (А) Человеческий белок TIGIT Fc связывается с клетками CHO. Дифференцированные концентрации человеческого TIGIT Fc и контроля синагис IgG1 оценивали по их способности связываться с клетками CHO в анализе связывания на основе FACS. (В) PVR человека экспрессируется на активированных CD4 Т-клетках. CD4 Т-клетки совместно культивировали с клетками CHO, экспрессирующими scFv антитела ОКТ3, и активировали в течение 5 суток. На 5-е сутки CD4 Т-клетки анализировали на экспрессию PVR и разведения CFSE.

На фиг. 47А-С изображены противоопухолевые ответы анти-mPVRIG и анти-PDL-1 антител в модели опухоли CT26. А-В. Группам из 10 мышей BALB/c подкожно вводили 5×10^5 клеток CT26. После того, как опухоли были измерены на 4-е сутки, мышей рандомизировали (средний объем опухоли на группу - 40 мм³), а затем лечили назначенным мкАт (100 или 200 мкг/доза, и/п) с последующими дополнительными дозами на 7, 11, 14, 18 и 21 сутки. А. Группы получали лечение 6 дозами отдельных агентов. Анти-PDL-1 по сравнению с контролем *** p < 0,0001. Объемы опухолей представлены в виде среднего объема + СОС. В. Объемы опухолей измеряли два раза в неделю. Указывается количество мышей без опухолей (TF) на группу. С. Коэффициенты выживаемости назначенных групп; анти-PDL1 по сравнению с кон-

тролем $**p = 0,005$.

На фиг. 48А-С изображены противоопухолевые ответы комбинации анти-PVRIG и анти-PDL1 антител в модели опухоли СТ26. А-В. Группам из 10 мышей BALB/c подкожно вводили 5×10^5 клеток СТ26. После того, как опухоли были измерены на 7-е сутки, мышей рандомизировали (средний объем опухоли на группу - 75 мм^3), а затем лечили назначенным мкАт (300 мкг/доза, и/п) с последующими дополнительными дозами на 11, 14, 18, 21 и 25 сутки. А. Группы получали лечение 6 дозами комбинированных агентов. Анти-PDL-1+ мкАт 407 по сравнению с контролем, $p = 0,0005$; анти-PDL-1 и мкАт 406 по сравнению с контролем, $p = 0,056$. В. Объемы опухолей измерялись $\times 3$ в неделю. Указывается количество мышей без опухолей (TF) на группу. С. коэффициенты выживаемости определенных групп; анти-PDL-1 + мкАт 407 против контроля $* p = 0,0088$.

На фиг. 49А-D изображены аминокислотные последовательности и последовательность нуклеиновой кислоты для вариабельной области тяжелой цепи (А и В, соответственно) и аминокислотные последовательности и последовательность нуклеиновой кислоты для вариабельной области легкой цепи (С и D, соответственно) для АВ-407 (BOJ-5G4-F4).

На фиг. 50 изображены аминокислотные последовательности константных доменов человеческого IgG1 (с некоторыми полезными аминокислотными заменами), IgG2, IgG3, IgG4, IgG4 с вариантом шарнира, который находит особое применение в данном изобретении, и константные области легких цепей каппа и лямбда.

На фиг. 51 изображены последовательности белков ВКД TIGIT человека и яванского макака (называемого супо) и ВКД PVR человека.

Фиг. 52. Изображена сводная таблица связываний из проточной цитометрии для анти-TIGIT fab. Все уникальные положительные по ИФА fab анализировали с помощью проточной цитометрии. Среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ) измеряли для клеток Expi293, сверхэкспрессирующих TIGIT человека или яванского макака, а также исходных клеток Expi293. Был рассчитан коэффициент СИФ для мишень-специфического и неспецифического связывания. Изображены данные для выбранных клонов.

На фиг. 53А и В изображены последовательности анти-TIGIT антител. Если не указано иное, то CDR, используют нумерацию IMGT (включая антитела из перечня последовательностей).

Фиг. 54. Изображены результаты FACS KD связывания анти-TIGIT мкАт с клетками Expi293, сверхэкспрессирующими TIGIT человека, как описано в примере 12.

Фиг. 55. Изображены результаты FACS KD связывания мкАт с клетками Expi293 яванского макака, сверхэкспрессирующими TIGIT.

Фиг. 56. Изображены результаты из примера 14, которые демонстрируют полученные кинетические константы скорости и равновесные константы диссоциации, где данные были достаточно надежными для оценки констант связывания.

На фиг. 57 А-В изображены результаты связывания человеческого PVR-Fc-варианта с клетками Expi293, сверхэкспрессирующими TIGIT человека, в примере 4. Фиг. А (слева): кривая связывания, построенная для конструкции человеческого PVR-m2aFc, титрованная с человеческими сверхэкспрессирующими TIGIT клетками Expi293. Изображены KD и 95% доверительный интервал. Фиг. В (справа): кривая связывания, построенная для конструкции человеческого PVR-hlFc, титрованная с человеческими сверхэкспрессирующими TIGIT клетками Expi293. Изображены KD и 95% доверительный интервал.

Фиг. 58. Изображена таблица фаговых антител, ингибирующих связывание PVR-m2aFc человека со человеческими TIGIT, сверхэкспрессированными на клетках Expi293. МкАт были протестированы против известного блокирующего эталонного антитела (BM26), а также изотипического контрольного антитела IgG4 (синагис). "Да" означает, что мкАт ингибировало hPVR аналогично BM26.

Фиг. 59. Изображена таблица значений ИК50 анти-TIGIT гибридных антител, ингибирующих связывание PVR-hlFc человека с TIGIT человека, сверхэкспрессированным на клетках Expi293. Значения являются репрезентативными для одного из двух независимых экспериментов. Результаты ИК50 для двух независимо проведенных экспериментов отличаются в диапазоне только в 1,2-2 раза.

Фиг. 60. Изображены результаты примера 6, согласно которому полученные из фага и BM антитела к TIGIT человека CPA.9.027, CPA.9.049, CPA.9.059, BM26 и BM29 увеличивают сигналинг ИЛ-2. BM26 и BM29 принадлежат к изотипу IgG4 человека (hIgG4 с вариантом S241P). Репрезентативные данные ($n \geq 2$) демонстрируют ОСЕ (среднее $\pm$ стандартное отклонение) сигнала люциферазы от 6-часового совместного культивирования человеческих клеток Jurkat ИЛ-2-RE люциферазы TIGIT человека и клеток aAPC CHO-K1 PVR человека. Концентрация каждого антитела составляла 10 мкг/мл.

Фиг. 61. Изображены дополнительные результаты примера 6, согласно которому полученные из фага и BM hIgG4 антитела к TIGIT человека CPA.9.027, CPA.9.049, CPA.9.059, BM26 и BM29 увеличивают сигналинг ИЛ-2 дозозависимым образом. BM26 и BM29 принадлежат к изотипу hIgG4. Репрезентативные данные ($n \geq 2$) демонстрируют ОСЕ (среднее $\pm$ стандартное отклонение) сигнала люциферазы от 6-часового совместного культивирования человеческих клеток Jurkat ИЛ-2-RE люциферазы и человеческих клеток aAPC CHO-K1 PVR. Для каждого антитела использовали 10-точечные, 2-кратные серии разведения, начиная с 20 мкг/мл.

Фиг. 62. Изображены результаты примера 6, согласно которому полученные из гибридомы и ВМ антитела к TIGIT человека СНА.9.536, СНА.9.541, СНА.9.546, СНА.9.547, СНА.9.560, ВМ26, и ВМ29 увеличивают сигналинг ИЛ-2. ВМ26 и ВМ29 принадлежат к изотипу mIgG1. Неблокирующее антитело против TIGIT человека, СНА.9.543, не усиливает сигналинг ИЛ-2. Репрезентативные данные ($n \geq 2$) демонстрируют ОСЕ (среднее $\pm$ стандартное отклонение) сигнала люциферазы от 6-часового совместного культивирования человеческих клеток Jurkat ИЛ-2-RE люциферазы и человеческих клеток aAPC CHO-K1 PVR. Концентрация каждого антитела составляла 10 мкг/мл.

Фиг. 63. Изображены результаты примера 6, согласно которым полученные из гибридомы и эталонные mIgG1 антитела против TIGIT человека, СНА.9.536, СНА.9.541, СНА.9.546, СНА.9.547, СНА.9.560 и ВМ26 увеличивают сигналинг ИЛ-2 дозозависимым образом. ВМ26 принадлежит к изотипу mIgG1. Репрезентативные данные ($n \geq 2$) демонстрируют ОСЕ (среднее $\pm$ стандартное отклонение) сигнала люциферазы от 6-часового совместного культивирования человеческих клеток Jurkat ИЛ-2-RE люциферазы и человеческих клеток aAPC CHO-K1 PVR. Для каждого антитела использовали 10-точечные, 2-кратные серии разведения, начиная с 20 мкг/мл.

Фиг. 64. Изображено, что фаговые, гибридомные и ВМ антитела против TIGIT человека, СРА.9.027, СРА.9.049, СРА.9.059, СНА.9.536, СНА.9.541, СНА.9.546, СНА.9.547, СНА.9.560, ВМ26 и ВМ29 увеличивают антигенспецифический сигналинг ИФН- γ . ВМ26 тестируется как оба изотипа hIgG4 и mIgG1, тогда как ВМ29 тестируется только как изотип hIgG4. Репрезентативные данные ($n = 2$) демонстрируют количество ИФН- γ (среднее $\pm$ стандартное отклонение) в супернатанте культуры после 24-часового совместного культивирования CMV-специфических CD8⁺ Т-клеток с клетками PVR человека Mel624. Концентрация каждого антитела составляла 10 мкг/мл. Mel624 PVR человека, используемым в анализе, вводили 0,0033 мкг/мл или 0,001 мкг/мл пептида.

Фиг. 65. Изображено, что фаговые, гибридомные и ВМ антитела против TIGIT человека, СРА.9.027, СРА.9.049, СРА.9.059, СНА.9.536, СНА.9.541, СНА.9.546, СНА.9.547 и СНА.9.560, такие как и ВМ26, усиливают антигенспецифический сигналинг ИФН- γ или отдельно (пустые столбцы), или в комбинации с анти-PVRIG антителом, СНА.7.518.1.H4 (S241P) (заштрихованные столбцы). ВМ26 принадлежит к изотипу mIgG1. Для терапий антителом контрольного изотипа открытый столбец относится только к изотипическому антителу, а заштрихованный столбец относится к изотипическому антителу в комбинации с СНА.7.518.1.H4 (S241P). Репрезентативные данные ($n = 2$) демонстрируют количество ИФН- γ (среднее $\pm$ стандартное отклонение) в супернатанте культуры после 24-часового совместного культивирования CMV-специфических CD8⁺ Т-клеток с клетками Mel624, сверхэкспрессирующими PVR человека и PVRL2 человека. Концентрация каждого антитела составляла 10 мкг/мл. Используемым в анализе клеткам PVR человека/ PVRL2 человека Mel624 вводили с 0,0033 или 0,001 мкг/мл пептида.

Фиг. 66. Изображено процентное увеличение секреции ИФН- γ с использованием антителами против TIGIT человека, СНА.7.518.1.H4 (S241P) и комбинации антител против TIGIT человека и СНА.7.518.1.H4 (S241P) по сравнению с соответствующими изотипическими контрольными антителами.

На фиг. 67 изображена дендрограмма для экспериментов по эпитоп-специфической сортировке из примера 7.

На фиг. 68 представлена группа антител из экспериментов по эпитопспецифической сортировке из примера 7.

Фиг. 69. Изображено связывание с высокой аффинностью с клетками, сверхэкспрессирующими TIGIT человека, при титровании дозы фаговых антител с созревшей аффинностью (СРА.9.083, СРА.9.086), гуманизированных гибридомных антител (СНА.9.547.7, СНА.9.547.13), контрольных антител (ВМ26, ВМ29) и контрольного изотипа hIgG4 (анти-синагис) на TIGIT-клетках Expi293, сверхэкспрессирующих TIGIT человека, как описано в экспериментах примера 3. Все антитела титровали с использованием серийного 2-кратного разведения в 11 точках, начиная с 10 мкг/мл (133,33 нМ [сайт связывания]). Для определения связывания анти-TIGIT антител к клеткам добавляли меченое AF647 козье анти-F(ab') человека (Jackson Immunoresearch). Изображены гСИФ анти-TIGIT антител, связанных с клетками Expi293, сверхэкспрессирующими TIGIT человека (черная линия), и исходными клетками Expi293 (серая линия). Значения $K_D \pm 95\%$ ДИ и приближенные кривые указаны под каждым графиком.

Фиг. 70. Изображено, что анти-TIGIT антитела перекрестно реагируют с TIGIT яванского макака при титровании дозы фаговых антител с зрелой аффинностью (СРА.9.083, СРА.9.086), гуманизированных гибридомных антител (СНА.9.547.7, СНА.9.547.13), эталонных антител (ВМ26, ВМ29) и изотипического контроля hIgG4 (анти-синагис) на клетках Expi293, сверхэкспрессирующих TIGIT яванского макака, как описано в экспериментах из примера 3. Все антитела титровали с использованием серийного 2-кратного разведения в 11 точках, начиная с 10 мкг/мл (133,33 нМ [сайт связывания]). Для определения связывания анти-TIGIT антител к клеткам добавляли меченое AF647 козье анти-F(ab') человека (Jackson Immunoresearch). Изображены гСИФ анти-TIGIT антител, связанных с клетками Expi293, сверхэкспрессирующими TIGIT яванского макака (черная линия), и исходными клетками Expi293 (серая линия). Значения $K_D \pm 95\%$ ДИ и приближенные кривые указаны под каждым графиком.

Фиг. 71. Изображено, что фаговые антитела с созревшей аффинностью перекрестно реагируют с

мышиним TIGIT в титровании дозы фаговых антител с созревшей аффинностью, переформатированных в мышиный IgG1 (mIgG1) (CPA.9.083, CPA.9.086), контрольных антител против мышиного TIGIT (BM27 mIgG1, BM30 mIgG1), а также изотипического контроля mIgG1 (анти-синагис), как описано в экспериментах из примера 3. А) гСИФ анти-TIGIT антител, связанных с клетками НЕК, сверхэкспрессирующими TIGIT мыши, (черная линия) и исходными клетками НЕК (серая линия). В) гСИФ анти-TIGIT антител (черная линия) или синагис mIgG1 (серая линия), связанная с регуляторными CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Т-клетками, выделенными из п/к имплантированных опухолей Rensa у мышей Balb/c. Анти-TIGIT антитела титровали с использованием серий 2- или 3-кратного разведения, начиная с 15 мкг/мл (200 нМ [сайт связывания]) или 10 мкг/мл (132 нМ [сайт связывания]), соответственно. AF647-меченое козье антимышиное IgG-Fc (Southern Biotech) добавляли к клеткам для обнаружения связывания анти-TIGIT антител на клетках, сверхэкспрессирующих TIGIT мыши. Анти-TIGIT антитела были непосредственно конъюгированы с AF647 для связывания Treg мыши. Показаны значения K_D для каждого анти-TIGIT антитела.

Фиг. 72. Изображено титрование дозы фаговых антител с созревшей аффинностью (CPA.9.083, CPA.9.086), гуманизированных гибридных антител (CHA.9.547.7, CHA.9.547.13) и контрольных антител (BM26, BM29) на CD95⁺CD28⁺CD8⁺CD3⁺ человеческих эффекторных Т-клетках памяти из МКПК 3 здоровых доноров (доноры 321, 322 и 334), как описано в экспериментах примера 3. МКПК окрашивали на поверхности антителами против следующих маркеров линии CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, CD28, CD56 и CD95 (BD Biosciences, BioLegend), а также водным красителем для живого и фиксированного материала live/dead fixable aqua dye (Life Technologies). Меченые AF647 анти-TIGIT антитела и изотипическое контрольное антитело hIgG4 (анти-синагис) затем титровали с использованием серийного 3-кратного разведения в 12 точках, начиная с 30 мкг/мл (396 нМ [сайт связывания]). Изображены гСИФ анти-TIGIT антител, связанных с эффекторными Т-клетками памяти. Значения K_D для каждого антитела у 3 разных доноров приведены в таблице. Фаговые антитела с созревшей аффинностью (CPA.9.083 и CPA.9.086) имели самую высокую аффинность связывания с человеческими эффекторными Т-клетками памяти.

Фиг. 73. Изображено титрование дозы фаговых антител с созревшей аффинностью (CPA.9.083, CPA.9.086, CPA.9.103), гуманизированного гибридного антитела (CHA.9.547.1) и контрольного антитела (BM26) на эффекторных CD95⁺CD28⁺CD8⁺CD3⁺ Т-клетках памяти из МКПК, выделенных из 2 наивных яванских макаков (BioreclamationIVT), как описано в экспериментах примера 3. МКПК окрашивали на поверхности антителами против следующих маркеров линий CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, CD28, CD56 и CD95 (BD Biosciences, BioLegend), а также водным красителем для живого и фиксированного материала live/dead fixable aqua dye (Life Technologies). Меченые AF647 анти-TIGIT антитела и изотипическое контрольное антитело hIgG4 (анти-синагис) затем титровали с использованием серийного 3-кратного разведения в 12 точках, начиная с 30 мкг/мл (396 нМ [сайт связывания]). ГСИФ анти-TIGIT антител, связанных с эффекторными Т-клетками памяти, показаны с вычитанием гСИФ изотипического контрольного антитела анти-синагис hIgG4. Значения K_D для каждого антитела у 2 разных доноров приведены в таблице. Фаговые антитела с созревшей аффинностью (CPA.9.083 и CPA.9.086) имели самую высокую аффинность связывания с эффекторными Т-клетками памяти яванского макака.

Фиг. 74. Изображена ПИР связывания анти-TIGIT антитела с TIGIT человека, яванского макака и мыши, как описано в экспериментах примера 5. Кинетические константы скорости и равновесной диссоциации для фаговых антител с созревшей аффинностью (CPA.9.083, CPA.9.086, CPA.9.103), гуманизированных гибридных антител (CHA.9.547.1 и CHA.9.547.7) и контрольных антител (BM26, BM29) были определены при помощи НИР на приборе ProteOn.

Фиг. 75. Изображено, что анти-TIGIT антитела блокируют взаимодействия PVR/TIGIT, как описано в экспериментах примера 4. Клетки Expi293, сверхэкспрессирующие TIGIT человека, предварительно инкубировали или с фаговыми антителами с созревшей аффинностью (CPA.9.083, CPA.9.086), гуманизированными гибридными антителами (CHA.9.547.7, CHA.9.547.13), контрольными антителами (BM26, BM29), или изотипическим контролем hIgG4 (анти-синагис). Все антитела титровали с использованием серийного 2,5-кратного разведения в 11 точках, начиная с 10 мкг/мл (133,33 нМ [сайт связывания]). После предварительной инкубации антитела к клеткам добавляли человеческий PVR-m2aFc в концентрации 158 нМ [сайт связывания] или ЭК₉₀. Затем к клеткам добавляли AF647-меченый козье антитело против IgG-Fc мыши (Southern Biotech) для обнаружения связывания анти-TIGIT антител. Процент ингибирования связывания PVR-m2aFc с клетками Expi293, сверхэкспрессирующими TIGIT человека, показан для каждого антитела. Значения ИК₅₀ для каждого антитела против TIGIT человека представлены в таблице (n = 2 эксперимента).

Фиг. 76. Изображены результаты примера 6, где фаговые антитела с созревшей аффинностью (CPA.9.083, CPA.9.086), гуманизированные гибридные антитела (CHA.9.547.7, CHA.9.547.13) и контрольное антитело (BM26) увеличивают сигналинг ИЛ-2 дозозависимым образом. Синагис hIgG4 представляет собой изотипическое контрольное антитело. Репрезентативные данные (n≥2) демонстрируют ОСЕ (среднее +/- стандартное отклонение) сигнала люциферазы от 6-часового совместного культивирования клеток Jurkat IL-2-RE люцифераза TIGIT человека и клеток CHO-K1 PVR человека. Серии с 19 точками, 1,5-кратным разведением, начиная с 20 мкг/мл, были использованы для каждого антитела.

Фиг. 77. Изображено, что анти-TIGIT антитела индуцируют ИФН- γ в ЦМВ-специфических CD8⁺ Т-клетках. Анализ *in vitro* для совместного культивирования с человеческими ЦМВ-специфическими CD8⁺ Т-клетками использовали для оценки влияния фаговых антител с созревшей аффинностью (CPA.9.083, CPA.9.086), гуманизированных гибридных антител (CHA.9.547.7, CHA.9.547.13) и контрольных антител (BM26, BM29) на антигенспецифическую секрецию цитокинов, как описано в экспериментах примера 6. Целевая клеточная линия, используемая в анализе, представляла собой HLA-A2⁺ клетки аденокарциномы поджелудочной железы, Рапс.05.04, которые эндогенно экспрессируют PVR и PVRL2 человека. В клетки Рапс.05.04 вводили пептид ЦМВ pp65 в концентрации 0,03 мкг/мл или 0,01 мкг/мл при 37°C в течение 1 часа. Затем клетки промывали и помещали 50000 клеток/лунку в 96-луночные круглодонные планшеты для культивирования ткани. Антитела против TIGIT человека или изотипическое контрольное антитело hIgG4 (анти-синагис) добавляли в концентрации 0,1 мкг/мл. Человеческие ЦМВ-специфические CD8⁺ Т-клетки от одного донора были размножены в соответствии с вышеприведенным протоколом. В каждую лунку добавляли 50000 человеческих CD8⁺ Т-клеток. Совместные культуры инкубировали при 37°C с 5% CO₂ в течение 24 часов. Количество человеческого интерферона гамма (ИФН- γ) в супернатанте совместной культуры измеряли с помощью проточной цитометрии с использованием цитометрического гранулотеста (BD Biosciences). Процентное увеличение секреции ИФН- γ для каждого антитела по сравнению с изотипом hIgG4 приведено в таблице (n=2 эксперимента).

Фиг. 78. Изображено, что анти-TIGIT антитела увеличивают ИФН- γ в комбинации с антителом к PVRIG, CHA.7.518.1.H4 (S241P). Анализ *in vitro* для совместного культивирования с человеческими ЦМВ-специфическими CD8⁺ Т-клетками использовали для оценки влияния фаговых антител с созревшей аффинностью (CPA.9.083, CPA.9.086), гуманизированных гибридных антител (CHA.9.547.7, CHA.9.547.13) и контрольных антител (BM26, BM29) на антигенспецифическую секрецию цитокинов в комбинации с анти-PVRIG антителом, CHA.7.518.1. Целевая клеточная линия, используемая в анализе, представляла собой HLA-A2⁺ клетки аденокарциномы поджелудочной железы, Рапс.05.04, которые эндогенно экспрессируют PVR и PVRL2 человека. В клетки Рапс.05.04 вводили пептид ЦМВ pp65 в концентрации 0,03 мкг/мл или 0,01 мкг/мл при 37°C в течение 1 ч. Затем клетки промывали и помещали в количестве 50000 клеток/лунку в 96-луночные круглодонные планшеты для культивирования ткани. Антитела против TIGIT человека или изотипическое контрольное антитело hIgG4 (анти-синагис) добавляли в концентрации 0,1 мкг/мл в комбинации с CHA.7.518.1 (заштрихованные столбцы) или контрольным изотипическим антителом hIgG4 в концентрации 10 мкг/мл (сплошные столбцы). Человеческие ЦМВ-специфические CD8⁺ Т-клетки от одного донора были размножены в соответствии с вышеприведенным протоколом. В каждую лунку добавляли в количестве 50000 человеческих CD8⁺ Т-клеток. Совместные культуры инкубировали при 37°C с 5% CO₂ в течение 24 ч. Количество человеческого ИФН- γ в супернатанте совместной культуры измеряли с помощью проточной цитометрии с использованием цитометрического гранулотеста (BD Biosciences). Процентное увеличение секреции ИФН- γ для каждого антитела по сравнению с изотипом hIgG4 приведено в таблице (n=2 эксперимента).

Фиг. 79. Изображен корреляционный анализ экспрессии PVRIG и TIGIT на CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках из диссоциированных опухолей. Для каждого образца опухоли рассчитывали среднее соотношение интенсивности флуоресценции (MFI_r) и проводили корреляционный анализ Спирмена, и указано значение r₂ и p.

Фиг. 80. Изображены результаты ингибирования роста опухоли и выживаемость у нокаутных по TIGIT мышей, получавших лечение с использованием антитела против PVRIG мыши. Группы из 7-10 мышей, нокаутных по TIGIT и C57BL/6 ДТ, п/к вводили 1×10^5 клеток B16/Db-hmgrp100. Мышей лечили назначенным антителом дважды в неделю в течение 3 недель, начиная с дня инокуляции (0 сутки). А) Средние объемы опухоли +/-стандартная ошибка среднего (СОС) показаны на верхнем графике, где *** означает значение $p < 0,001$ для нокаутных по TIGIT, получавших лечение антителом против PVRIG мыши (клон 407) по сравнению с C57BL/6 ДТ, получавшими лечение контрольным антителом mIgG1. Объемы опухолей для отдельных мышей в каждой группе лечения антителами показаны в виде лепестковых диаграмм на нижних графиках. В) Таблица, которая описывает TGI, измеренные в указанные дни, по сравнению с контрольными мышами C57BL/6 ДТ, получавшими лечение с помощью изотипа mIgG1. С) Выживаемость мышей после п/к инъекции клеток B16/Db-hmgrp 100.

На фиг. 81А-С изображены комбинированные терапии с указанными антителами по сравнению с контролем в клетках Mel-624, Colo205 и Рапс.05.04. gp100 или CMVpp65-специфические Т-клетки совместно культивировали с клетками Mel-624, Colo205 и Рапс.05.04, пептидом gp100 или CMVpp65 и указанными антителами в концентрации 10 мг/мл. Концентрацию ИФН- γ в кондиционированных средах определяли через 24 ч. Изображено среднее значение + станд. откл. из трех значений. Показан % изменения ИФН- γ для каждого условия относительно hIgG4.

На фиг. 82А-С изображена экспрессия PD-1/TIGIT/PVRIG на CD8 Т-клетках и экспрессия PD-L1, PVR, PVRL2 на клетках Colo205, Рапс.05.04. А) Экспрессия PVRIG, TIGIT и PD-1 на CMVpp65 -реактивных Т-клетках, размноженных с помощью пептида pp65 с ИЛ-2 и ИЛ-7 в течение 10 суток. Изображена экспрессия PVRIG, TIGIT и PD-1 на CMVpp65-реактивных Т-клетках. В) Изображена экспрес-

сия PD-L1, PVR и PVRL2 на клетках Colo205 и Рапс.05.04. С) CMVpp65-специфические Т-клетки совместно культивировали с клетками Colo205 и Рапс.05.04, пептидом CMVpp65 и указанными антителами в концентрации 10 мг/мл. Концентрацию ИФН- γ в кондиционированных средах определяли через 24 часа. Изображено среднее значение $\pm$ станд. откл. из трех значений. Показано % изменения ИФН- γ для каждого условия относительно hIgG4.

Фиг. 83. PVRIG экспрессируется наиболее высоко в субпопуляциях цитотоксических лимфоцитов от рака человека. А) Изображена экспрессия PVRIG в субпопуляциях лейкоцитов из МКПК 5-8 здоровых доноров. Экспрессия PVRIG определяется как отношение СИФ PVRIG к СИФ изотипического контроля. В) Экспрессия PVRIG, TIGIT, CD96 и PD-1 на Treg периферической крови по сравнению с субпопуляциями CD8 Т-клеток из МКПК 5 здоровых доноров. С) ЦМВ pp65-специфические Т-клетки у 3 здоровых доноров были размножены *in vitro* с помощью пептида pp65 (495-503), ИЛ-2 и ИЛ-7 в течение периода длительностью до 7 суток. Изображена экспрессия TIGIT (синий) и PVRIG (черный) на HLA-A2/pp65 (495-503) на тетрамер-положительных клетках. D) Т-клетки человека культивировали с аллогенными ДК и на 0, 1, 2 и 7 сутки после активации экспрессия TIGIT и PVRIG показана на CD4⁺ Т-клетках. E) Репрезентативные графики FACS, демонстрирующие экспрессию PVRIG (синий) по сравнению с изотипическим контролем (красный) на TIL (CD4 Т-клетки, CD8 Т-клетки и NK-клетки) из репрезентативного рака легкого и почки. F) Изображена совместная экспрессия PVRIG, TIGIT и PD-1 на CD4 и CD8 TIL из образца рака легкого. G) Изображена экспрессия PVRIG на CD8⁺ и CD4⁺ TIL из диссоциированных опухолей человека различных типов рака. Каждая точка представляет собой отдельную опухоль у отдельного пациента. H) Была оценена относительная экспрессия на CD8 TIL против Treg TIL для PVRIG, TIGIT и PD-1 из опухолей эндометрия, почки и легкого. Для каждой опухоли кратную экспрессию на CD8 TIL нормировали по отношению кратной экспрессии на Treg TIL и наносили на график. Для A, B, C, G и H среднее значение $\pm$ СОС показано при помощи планок погрешностей.

Фиг. 84. Экспрессия PVRL2 усиливается в микроокружении опухоли. А) Экспрессия PVRL2 оценивалась при помощи ИГХ на опухолях легкого, яичников/эндометрия, молочной железы, толстой кишки, почек и меланомы. Столбцы отображают среднее значение $\pm$ СОС. Для каждой опухоли 2 биоптата оценивались патологоанатомом и количественно оценивали по распространенности и интенсивности окрашивания мембраны на опухолевых клетках, как описано в дополнительных методах. Для каждой опухоли показана средняя оценка 2 биоптатов. В) Изображена репрезентативная опухоль меланомы, на которой изображена экспрессия PVRL2 на опухолевых клетках (стрелка) и в иммунных клетках (*) в строме. С) Изображена экспрессия PVRL2 на шкале Iog2 из диссоциированных опухолей, определенных при помощи FACS на субпопуляции CD45⁻, CD14⁺ TAM и Lin⁻ CD14⁺ CD33^{hi} мДК (миелоидные дендритные клетки) клеток. Показано среднее $\pm$ СОС для каждого типа рака. Пунктирная линия означает отсутствие окрашивания. Для каждого типа клеток для анализа необходимо было по меньшей мере 100 событий. D) Репрезентативные графики FACS для экспрессии PVRL2 (синий) по сравнению с IgG (красный) показаны для рака легкого. E) Для образцов опухоли, где мы были в состоянии оценить экспрессию как PVRIG, так и PVRL2, экспрессию PVRIG на CD8⁺ Т-клетках изображено на графике против экспрессии PVRL2 на CD14⁺ и CD45 TAMS⁻ клетках для каждой опухоли. Каждая точка представляет собой отдельный образец опухоли. Красная линия отображает 2-кратную экспрессию PVRIG или PVRL2 по сравнению с IgG. На таблице на фиг. 84F продемонстрировано преобладание PVRL2 в различных образцах опухоли.

Фиг. 85. Разная регуляция PVRL2 и PD-L1 на опухолевых клетках. А) Экспрессию PD-L1 и PVRL2 оценивали при помощи ИГХ на серийных срезах. Образцы опухолей из фиг. 84А были сгруппированы по типу ткани и изображена экспрессия PVRL2 на отрицательных по PD-L1 и положительных PD-L1. PD-L1-отрицательные опухоли были определены как такие, что не имели мембранного окрашивания опухолей или иммунных клеток в обоих двух идентичных биоптатах для данной опухоли. PD-L1-положительное окрашивание определяли как мембранное окрашивание по меньшей мере на 1 из биоптатов опухоли. Столбцы отображают среднее значение $\pm$ СОС для каждой группы. В, С) Репрезентативная экспрессия PVRL2⁺ PD-L1⁻ опухоли эндометрия (В) и PVRL2⁺ PD-L1⁻ опухоли легкого (С). D) Незрелые КМ-ДК (дендритная клетка костномозгового происхождения) культивировали с указанными стимулами и экспрессию PVR, PVRL2 и PD-L1 оценивали при помощи FACS на 2-е сутки культивирования. Для каждого условия экспрессию нормализовали по контрольным условиям только со средой. E) Изображена экспрессия PVR, PVRL2 и PD-L1 на клетках HT-29, обработанных ИФН- γ или только средами. PD-L1 или PVRL2 изображены синим цветом, а окрашивание с использованием изотипического контроля IgG изображено красным.

Фиг. 86. CHA.7.518.1.H4 (S241P) представляет собой высокоаффинное антитело, которое усиливает активацию Т-клеток. А) Изображено связывание CHA.7.518.1.H4 (S241P) или изотипического контроля IgG с HEK293 PVRIG или HEK293 исходными клетками с помощью FACS. Для связывания CHA.7.518.1.H4 (S241P) с клетками HEK293 hPVRIG, HEK293 cPVRIG и Jurkat показаны значения KD, определенные методом FACS. В) CHA.7.518.1.H4 (S241P) нарушает связывание PVRL2 Fc с клетками HEK293, эктопически экспрессирующими PVRIG. Изображено среднее значение $\pm$ станд. откл. из трех значений. С) CHA.7.518.1.H4 (S241P) блокирует связывание PVRIG Fc с клетками HEK293, которые эн-

догенно экспрессируют PVRL2. D) Человеческие CD4 Т-клетки совместно культивировали с клетками иАПК CHO, экспрессирующими анти-CD3 антитела, что связываются с поверхностью клетки, и hPVRL2 в присутствии 10 мкг/мл анти-PVRIG антител и изотипических антител IgG человека. Изображено влияние анти-PVRIG Ат на пролиферацию CD4 Т-клеток, выделенных из 11 разных доноров. Столбцы отображают среднее $\pm$ СОС. E) gp100-специфические линии Т-клеток (TIL-209, TIL-463) совместно культивировали с клетками CHO, модифицированными для экспрессии HLA-A2 и PVRL2, вместе с 10 мкг/мл анти-PVRIG или изотипического контрольного антитела IgG. Продуцирование ИФН- γ и ФНО- α было проверено через 24 ч после совместного культивирования. Изображено среднее значение $\pm$ станд. откл. из трех значений. Процентное изменение ИФН- γ и ФНО- α для каждого состояния относительно изотипического контроля показано числом над каждым столбцом. F) Изображена экспрессия PVR, PVRL2 и PD-L1 (красный) относительно IgG (синий) на клетках MEL624, Colo205 и Panc.05.04. Для Т-клеток показана экспрессия PVRIG, TIGIT и PD-1 (красный) относительно IgG (синий) на TIL-209 и TIL-463 gp100-специфических Т-клетках, а также на CMVpp65-специфических Т-клетках. Для размножения CMVpp65-реактивных Т-клеток, МКПК культивировали с пептидом pp65 (495-503), ИЛ-2 и ИЛ-7 в течение 10 суток. Экспрессия PVRIG, TIGIT, PD-1 показана на HLA-A2/pp65 тетрамер-положительных клетках G) gp100-специфические Т-клетки (TIL-209, TIL-463), размноженные из TIL, полученных из опухолей меланомы, культивировали совместно с клетками MEL624 в присутствии 10 мкг/мл указанных антител. Концентрацию ИФН- γ в кондиционированных средах определяли через 24 ч. H, I) Размноженные CMVpp65-специфические Т-клетки культивировали совместно с клетками Colo205 и Panc.05.04, пептидом CMVpp65 и указанными антителами в 10 мкг/мл. Концентрацию ИФН- γ в кондиционированных средах определяли через 24 ч. Для E, G, H, I показано среднее значение $\pm$ станд. откл. из трех значений. Процентное изменение ИФН- γ для каждого условия относительно изотипического контроля показано числом над каждым столбцом.

Фиг. 87. У PVRIG-дефицитных мышей повышена функция Т-клеток. A) Была оценена экспрессия РНК PVRIG, измеренная при помощи qRT-PCR (количественной ПЦР в реальном времени) из очищенных субпопуляций иммунных клеток мыши. Относительная экспрессия для генов домашнего хозяйства определялась методом Δ Ct. B) Трансгенные pmel CD8⁺ TCR Т-клетки активировали с gp100 (25-33) и уровни РНК-транскриптов PVRIG и TIGIT, оцененными с помощью qRT-PCR в указанные моменты времени. На графике показано среднее значение $\pm$ СОС результатов из 5 различных экспериментов. C) Селезенки собирают из PVRIG^{-/-} и ДТ однопометных животных и анализируют при помощи проточной цитометрии на экспрессию PVRIG на NK, CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках ("покоящиеся" клетки). Кроме того, CD3⁺ Т-клетки были выделены из спленоцитов и активированы в течение 11 суток с помощью анти-CD3/анти-CD28 гранул. После активации экспрессию PVRIG на CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках ("активированные" клетки) анализировали с помощью проточной цитометрии. Каждая точка представляет собой клетки, полученные от отдельной мыши. D) Спленоциты с ДТ и PVRIG^{-/-} были помечены красителем для оценки пролиферации клеток eFluor450 и культивировали в присутствии контроль-Fc (мышинного IgG2a) или мышинного PVRL2 Fc. Через 4 суток культивирования деление клеток анализировали с помощью проточной цитометрии. Представлены результаты анализа FACS из эксперимента (слева) и суммарный процент ингибирования PVRL2 Fc (определяемый как % пролиферации контроль-Fc, вычитаемый из % пролиферации PVRL2 Fc). Представлены 3 независимых эксперимента (справа). * указывает р-значение <0,05, парный t-критерий Стьюдента для изменения пролиферации в присутствии PVRL2-FC относительно пролиферации в присутствии контрольного белка в ДТ по сравнению с PVRIG^{-/-}-Т-клетками. E) pmel CD8⁺ Т-клетки, полученные из мышей pmel PVRIG^{-/-} или pmel PVRIG ДТ, активировали в течение 11 суток с их когнатным пептидом и ИЛ-2. Активированные pmel CD8⁺ клетки затем культивировали с клетками B16-Db/gp100 в течение 18 ч и после совместного культивирования оценивали на экспрессию CD107 и на продукцию цитокинов. Представлены четыре независимых эксперимента, как указано каждой парной точкой. * указывает на р-значение <0,05, t-критерий Стьюдента сравнения PVRIG^{-/-} и ДТ.

Фиг. 88. Дефицит PVRIG приводит к уменьшению роста опухоли и увеличению эффекторного механизма CD8⁺ Т-клеток. A) C57BL/6 ДТ или PVRIG^{-/-} мышам подкожно вводили 5×10^5 клеток MC38. Объемы опухолей измеряли 2 раза в неделю, n = 10 мышей на группу, показано среднее значение $\pm$ СОС, * указывает на р-значение <0,05 согласно непарному t-критерию Стьюдента для мышей ДТ против PVRIG^{-/-} мышей (ANOVA). B) Изображены отдельные кривые роста опухоли, n = 10 мышей на группу, изображен один репрезентативный эксперимент (n = 2). C) C57BL/6 ДТ или PVRIG^{-/-} мышам подкожно вводили 5×10^5 клеток MC38. На 14-е сутки после инокуляции мышей лечили анти-PD-L1, 2 раза в неделю в течение 2 недель. Объемы опухолей измеряли 2 раза в неделю, n = 10 мышей на группу, показано среднее значение $\pm$ СОС, р-значение = 0,052 согласно непарному t-критерию Стьюдента для мышей ДТ против PVRIG^{-/-} мышей, получавших лечение анти-PD-L1. D) Изображены отдельные кривые роста опухоли. Изображен один репрезентативный эксперимент (n = 2). E-H) В отдельных повторных экспериментах опухоли собирали на 18-е сутки после того, как мыши получили 2 дозы анти-PD-L1 или соответствующего изотипического контроля. Диссоциированные опухоли были обогащены для CD45⁺ клеток до стимуляции в течение 4 ч с помощью РМА и ионизирующего излучения в присутствии Брелфелдина А. На графиках

изображены общие количества на мг опухолевой ткани CD45⁺ иммунных клеток, CD8⁺ Т-клеток и интерферон- γ продуцирующих CD8⁺ Т-клеток из мышей дикого типа и PVRIG^{-/-}, обработанных изотипом, (Е) и из мышей дикого типа и PVRIG^{-/-}, обработанных анти-PD-L1 (F). G-H). Изображена частота CD8⁺ ИФН- α ⁺ ФНО- γ ⁺ эффекторных клеток в опухоли-дренирующих лимфоузлах из PVRIG^{-/-} мышей, получавших лечение изотипом и анти-PD-L1, в сравнении с их соответствующей когортой дикого типа. Для Е-Н изображены средние значения $\pm$ СОС и показаны р-значения из непарного t-критерия Стьюдента.

Фиг. 89. Антагонистические анти-PVRIG антитела синергетически ингибируют рост опухоли в комбинации с ингибиторами PD-1 или генетическим дефицитом TIGIT. А) Было показано связывание слитого белка mPVRL2 Fc с модифицированными клетками mVVRIG HEK293, которые были предварительно инкубированы с серийными разведениями анти-mPVRIG мкАт или изотипического контрольного Ат IgG. В) Мышам BALB/c подкожно вводили 5×10^5 клеток CT26. На 14-е сутки после инокуляции мышей умерщвляли, а селезенку, дренирующие лимфатические узлы и опухоли собирали. Клетки анализировали с помощью проточной цитометрии на экспрессию PVRIG на CD3⁺ CD4⁺ Т-клетках, CD3⁺ CD8⁺ Т-клетках, CD3⁺ CD49b⁺ NK - клетках, CD11b⁺ Gr-1⁺ миелоидных супрессорных клетках (МЛСК) и CD11b⁺ F4/80⁺ макрофагах. С, D) Мышам BALB/c подкожно вводили 5×10^5 клеток CT26. На 7-е сутки после инокуляции мышей лечили анти-PD-L1 и/или анти-PVRIG Ат, 2 раза в неделю в течение 3 недель (стрелки указывают на лечение Ат). С) Изображены объемы опухолей. *** указывают на р-значение <0,001 (ANOVA) для α PD-L1 + IgG2b крысы по сравнению с α группами, получавшими лечение PD-L1 + α PVRIG. Стрелки указывают на дозирование антител. D. Анализ выживаемости мышей с полным ответом. * указывает на р-значение <0,05 (тест логарифмических рангов) для α PD-L1 + IgG2b крысы по сравнению с α PD-L1 + α PVRIG лечеными группами. Изображено одно репрезентативное исследование из 3 исследований. Е. C57BL/6 или TIGIT^{-/-} мышам подкожно вводили 1×10^5 клеток B16/Db-hmgrp100. Мыши получали лечение 2 раза в неделю в течение 3 недель назначенным мкАт, начиная со дня инокуляции (0 сутки). Е. Объемы опухолей измеряли 2 раза в неделю, а показано среднее значение $\pm$ СОС. Ингибирование роста опухоли, измеренное в указанные дни, по сравнению с контролем ДТ + изотипическим контролем mIgG1. *** указывает на р-значение <0,001 для TIGIT^{-/-} + α PVRIG по сравнению с ДТ + изотипическим контролем mIgG1. Стрелки указывают на дозирование антител. F. Изображены отдельные кривые роста опухоли для каждой мыши. Изображен один репрезентативный эксперимент из 2 выполненных.

Фиг. 90. PVRIG экспрессируется на Т и NK-клетках TIL при раке человека. А) Изображена экспрессия PVRIG, TIGIT, CD96 и PD-1 на CD4 Т-клетках из здоровых донорных МКПК. Изображено среднее значение $\pm$ СОС. В) Т-клетки человека были совместно культивированы с аллогенными МКПК и экспрессией белка PVRIG на CD4 и CD8 Т-клетках (сверху). С) Опухоли отделяли, а отдельные клетки активировали с использованием анти-CD3 и анти-CD28. Экспрессию PVRIG (синяя) относительно изотипического контроля IgG (красная) оценивали на 0-е сутки (непосредственно ex vivo) и на 5-е сутки после активации. D) Изображена экспрессия PVRIG на NK-клетках из диссоциированных опухолей человека. Каждая точка представляет собой отдельную опухоль у отдельного пациента. Изображено среднее значение $\pm$ 95% доверительный интервал. D) Диссоциированные опухолевые клетки активировали с использованием анти-CD3 и анти-CD28 гранул в течение 5 суток. Экспрессия PVRIG (синий) относительно контроля IgG (красный) на CD4 и CD8 Т-клетках на 0-е сутки непосредственно ex vivo, и на 5-е сутки после активации показана для 2 образцов диссоциированных опухолей. Е) Экспрессию PVRIG оценивали на CD4 и CD8 Т-клетках из диссоциированных опухолей и из диссоциированной соответствующей донорской нормальной смежной ткани. Каждая линия представляет собой соответствующие ткани, полученные от отдельного пациента. Был проведен парный t-критерий Стьюдента. F) Изображен корреляционный анализ величины кратной экспрессии PVRIG, TIGIT и PD-1 относительно изотипического контроля IgG на CD4 и CD8 Т-клетках из опухолей. Каждая точка представляет собой отдельный образец опухоли. Изображены коэффициент корреляции Спирмена и р-значение.

Фиг. 91. Экспрессия PVRL2 усиливается при онкологических заболеваниях толстой кишки, кожи и молочной железы. А) Микрофотографии, которые демонстрируют связывание антитела против PVRL2 человека Sigma со срезами FFPE (зафиксированное формалином и залитое парафином) положительных клеток, CHO-S PVRL2 человека (справа) по сравнению с отрицательными клетками, CHO-S (слева), после демаскирования антигена при pH9. В) Анти-PVRL2 антитело тестировали на панели из PVRL2⁺ (HT29, MCF7, PC3, PANC1, RT4, NCI-H1573) и PVRL2⁻ (Jurkat, OPM2, Daudi, CA46) клеточных линий. С-F) Пример экспрессии PVRL2 в нормальных и раковых тканях легких. С) Нормальная ткань, которая не демонстрирует окрашивания. D) Аденокарцинома легкого, которая демонстрирует частичное положительное окрашивание. Е) Аденокарцинома легкого, которая демонстрирует положительное окрашивание. F) Аденокарцинома легкого, которая демонстрирует сильное положительное окрашивание.

Фиг. 92. PVRL2 повышается на TAM и CD45⁻ клетках в опухоли по сравнению с нормальной смежной тканью. Изображена экспрессия PVRL2 на CD45⁻ клетках и TAM из донорской подобранной опухоли и нормальной смежной ткани. Изображено р-значение парного t-критерия Стьюдента.

Фиг. 93. PVRIG и PVRL2 совместно экспрессируются в одном и том же образце опухоли. Экспрес-

сия PVRIG на CD4-T-клетках (А) и NK-клетках (В) нанесена на график против экспрессии PVRL2 на ТАМ для отдельной опухоли.

Фиг. 94. Активность CHA.7.518.1.H4 (S241P) на человеческих Т-клетках. А) Экспрессия PVRIG на CD4 Т-клетках, активированных клетками CHO, экспрессирующими анти-CD3 и PVRL2, которые связываются с клеточной поверхностью. В) Экспрессия HLA-A2, В-2m и PVRL2 показана на исходных CHO-S и модифицированных CHO-S линиях клеток. Кратная экспрессия относительно изотипа изображена числом. С) Клетки CHO, эктопически экспрессирующие анти-CD3 и PVRL2, связанные с клеточной поверхностью, совместно культивировали с очищенными CD8 Т-клетками в присутствии различных концентраций анти-PVRIG Ат или соответствующего контроля IgG. Изображен процент пролиферации. Каждая точка представляет собой среднее значение трех значений. D) Клетки CHO, которые эктопически экспрессируют HLA-A2/B2m и PVRL2, совместно культивировали с 2 gp100-специфическими Т-клеточными линиями (TIL F4, TIL 209) в присутствии 1 мкг/мл gp100 и различными концентрациями анти-PVRIG антитела или соответствующего контроля IgG. Концентрации ФНО- α на 3-е сутки совместного культивирования снижаются. Каждая точка представляет собой среднее значение трех значений.

Фиг. 95. Характеристика связывающих взаимодействий mPVRIG и суррогатного анти-mPVRIG антитела. А, В) Связывание mPVRIG с mPVRL2 оценивали при помощи поверхностного плазмонного резонанса. С) Растворимый рецептор Fc или контрольные белки инкубировали дозозависимым образом с иммобилизованным mPVRL2 HIS в формате ИФА. Изображен связанный рецептор Fc. D) Растворимый белок PVRL2 HIS инкубировали дозозависимым образом на планшетах, покрытых PVRIG Fc или DNAM Fc. E) Показано связывание mPVRIG Fc или контрольного Fc-слитого белка с клеточной линией B16-F10, трансфицированным кИПНК (короткие интерферирующие РНК) mPVRL2, кИПНК mPVR или трансфекцией скремблированной кИПНК. F) Характеристика аффинности крысиного мкАт против PVRIG мыши была выполнена путем изучения связывания анти-mPVRIG с клетками HEK293, сверхэкспрессирующих mPVRIG. G) Изображена характеристика аффинности крысиного мкАт против PVRIG мыши, выполненная путем изучения связывания анти-mPVRIG с клеточной линией D10.G4.1, эндогенно экспрессирующей mPVRIG, против изотипического контроля IgG крысы. H) Связывание анти-mPVRIG с клетками D10.G4.1, трансфицированных мышшиной PVRIG-кИПНК (зеленая гистограмма) против scg кИПНК (оранжевая гистограмма). I) Связывание mPVRIG Fc, предварительно инкубированного с анти-mPVRIG Ат с клетками B16-F10, которые эндогенно экспрессируют PVRL2

Фиг. 96. Создание нокаутных по PVRIG и TIGIT трансгенных мышей. Линии мышей с условным нокаутом PVRIG и нокаутом Tigit были созданы в Ozgene Pty Ltd (Бентли, Западная Австралия, Австралия). А) Нацеливающий конструкт, в котором экзоны PVRIG от 1 до 4 были фланкированы, подвергали электропорации в клеточную линию C57BL/6 ES, Bruce 4 (Koentgen et al, Int Immunol 5: 957-964, 1993). В) Нацеливающий конструкт, в котором кодирующая область экзона Tigit 1 (включая ATG) и экзоны 2 и 3 были заменены на FRT-фланкированную нео кассету, подвергали электропорации в клеточную линию C57BL/6 ES, Bruce4. Гомологичные рекомбинантные клоны клеток ES идентифицировали с помощью гибридизации с использованием саузерн-блоттинга и вводили в бластоцисты goGermline (Koentgen et al., genesis 54: 326-333, 2016). Мужские химерные мыши были получены и скрещены с самками C57BL/6J для создания гетерозиготного потомства зародышевой линии с фоном C57BL/6. Мышей зародышевой линии скрещивали с распространенной линией мышей FLP C57BL/6 для удаления FRT-фланкированной селективируемой маркерной кассеты и генерирования условных или нокаутных аллелей (для PVRIG и Tigit, соответственно). Для нокаута PVRIG мышей затем перекрещивали с распространенной линией мыши Cre C57BL/6 для удаления loxP фланкированных экзонов и генерировали нокаутный аллель.

Фиг. 97. Нокаутные по PVRIG мыши являются иммунно-фенотипически подобными мышам дикого типа. Мышей (n = 5 для когортных групп с диким типом и PVRIG) подвергали эвтаназии до того, как венозную кровь отбирали в пробирки, покрытые антикоагулянтом, и отбирали органы. Отдельные клетки были выделены из свежесобранного костного мозга, тимуса, селезенки, кожных и брыжеечных лимфатических узлов. Клетки окрашивали флюорохром-конъюгированными поверхностными маркерными антителами и считывали на проточном цитометре BD LSR Fortessa. На панелях изображены сопоставимые частоты миелоидных клеток (А), дендритных клеток (В), В-клеток (С), Т-клеток (D), CD4 Т-клеток (Е), CD8 Т-клеток (F) и NK-клеток (G) по типам лимфоидных тканей. (H-I) Цельная венозная кровь была проведена через ветеринарную гематологическую систему Nemavet 950 для сравнения дифференциальных показателей и частот подтипов клеток крови у мышей дикого типа и PVRIG-дефицитных мышей.

Фиг. 98. Повышенная эффекторная функция Т-клеток у PVRIG^{-/-} мышей, получавших лечение анти-PDL1, по сравнению с мышами ДТ, получавшими лечение анти-PD-L1. Опухоли MC38 инокулировали в мышей ДТ или PVRIG^{-/-} и впоследствии лечили анти-PD-L1 или изотипическим контролем IgG2b крысы. На 18-е сутки CD45⁺ инфильтрирующие опухоли лимфоциты выделяли из опухолей, экстрагировали РНК и выполняли профилирование транскрипта. Изображено несколько генов, связанных с Т-клетками, причем каждая точка представляет собой отдельную мышь. Изображены р-значения для t-критерия Стьюдента.

Фиг. 99. Анти-TIGIT и анти-PVRIG антитела индуцируют гибель опухолевых клеток. Анализ in vitro совместного культивирования с размноженными человеческими ЦМВ-специфическими CD8⁺ Т-

клетками был использован для оценки влияния контрольного анти-TIGIT антитела и CHA.7.518.1.H4 (S241P) на антигенспецифическое уничтожение опухолевых клеток. HLA-A2+ целевые клеточные линии, используемые в анализе, представляли собой Mel624 (A) и Panc05.04 (B). Синагис hIgG4 является изотипическим контрольным антителом. Активность люциферазы в целевых клетках измеряли с использованием субстрата люциферазы Bio-Glo. Репрезентативные данные ($n \geq 2$) демонстрируют процент специфического уничтожения (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение) клеток Mel624 или Panc05.04 после 16-часового совместного культивирования с человеческими ЦМВ-специфическими CD8+ Т-клетками от трех разных доноров.

Фиг. 100. Дозозависимое уничтожение опухолевых клеток анти-TIGIT антителами с помощью CHA.7.518.1.H4 (S241P). Для оценки влияния двух различных анти-TIGIT антител, BM26 и CPA.9.086, в комбинации с CHA.7.518.1.H4 (S241P) на антигенспецифическое уничтожение клеток Mel624 использовали анализ совместного культивирования *in vitro* с человеческими ЦМВ-специфическими CD8+ Т-клетками. Активность люциферазы в целевых клетках измеряли субстратом люциферазы Bio-Glo. Репрезентативные данные ($n \geq 2$) демонстрируют процент специфического уничтожения (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение) клеток Mel624 после 16-часового совместного культивирования с человеческими ЦМВ-специфическими CD8+ Т-клетками от одного донора.

Фиг. 101. Последовательности CDR CPA.9.086, IMGT и нумерация Кабат.

Фиг. 102. Комбинация анти-TIGIT hIgG4 + CHA.7.518.1.H4 (S241P) индуцирует уничтожение опухолевых клеток. Совместное культивирование ЦМВ-реактивных CD8+ Т-клеток с Mel624 PVR, PVRL2 и с единичной дозой люциферазы OE 10 мкг/мл aTIGIT Ат и 10 мкг/мл CHA.7.518.1.H4 (S241P) с ЦМВ-реактивным донором 4, при этом титровали дозу, начиная с 0,5 мкг/мл aTIGIT Ат и 10 мкг/мл CHA.7.518.1.H4 (S241P) с ЦМВ-реактивным донором 156.

V. Подробное описание сущности изобретения

A. Обзор

Данное изобретение обеспечивает ряд полезных антител для применения отдельно или в комбинации для лечения рака. Рак можно рассматривать как неспособность организма пациента распознавать и элиминировать раковые клетки. Во многих случаях эти трансформированные (например, раковые) клетки противодействуют иммунному надзору. Существуют естественные механизмы контроля, которые ограничивают активацию Т-клеток в организме, чтобы предотвратить неограниченную активность Т-клеток, которая может быть использована раковыми клетками для уклонения или подавления иммунного ответа. Восстановление способности иммунных эффекторных клеток, особенно Т-клеток, распознавать и уничтожать рак является целью иммунотерапии. Область иммуноонкологии, которую иногда называют "иммунотерапией", быстро развивается, с несколькими недавними утвержденными антителами, ингибирующими контрольные точки Т-клеток, такими как Yervoy, Keytruda и Opdivo. Данные антитела обычно называются "ингибиторами контрольных точек", поскольку они блокируют в норме отрицательные регуляторы Т-клеточного иммунитета. Как правило, понятно, что для контроля оптимального антигенспецифического иммунного ответа можно использовать различные иммуномодулирующие сигналы, как костимуляторные, так и коингибиторные. Как правило, эти антитела связываются с белками-ингибиторами контрольных точек, такими как CTLA-4 или PD-1, которые при нормальных обстоятельствах предотвращают или подавляют активацию цитотоксических Т-клеток (ЦТЛ). Путем ингибирования белка контрольной точки, например, посредством использования антител, которые связывают эти белки, может быть достигнут повышенный Т-клеточный ответ против опухолей. То есть эти белки контрольных точек рака подавляют иммунный ответ; когда белки блокируются, например, с использованием антител к белку контрольной точки, иммунная система активируется, что приводит к иммунной стимуляции, что приводит к лечению таких патологических состояний, как рак и инфекционное заболевание.

Данное изобретение направлено на применение антител к дополнительным белкам контрольной точки, PVRIG и TIGIT. PVRIG экспрессируется на клеточной поверхности NK- и Т-клеток и имеет несколько сходств с другими известными иммунными контрольными точками. Идентификация и методы, используемые для того, чтобы показать, что PVRIG является рецептором контрольной точки, обсуждаются в WO 2016/134333, явно включенной в данный документ посредством ссылки. Антитела к PVRIG человека, которые блокируют взаимодействие и/или связывание PVRL2, приведены в данном документе. Когда PVRIG связывается его лигандом (PVRL2), возникает ингибирующий сигнал, который действует для ослабления иммунного ответа NK- и Т-клеток против целевой клетки (то есть аналогично PD-1/PDL1). Блокирование связывания PVRL2 с PVRIG отключает этот ингибирующий сигнал PVRIG и, как результат, модулирует иммунный ответ NK- и Т-клеток. Использование анти-PVRIG антитела, которое блокирует связывание с PVRL2, является терапевтическим подходом, который повышает уничтожение раковых клеток NK- и Т-клетками. Были созданы блокирующие антитела, которые связывают PVRIG и блокируют связывание его лиганда, PVRL2. Представлены анти-PVRIG антитела в комбинации с другими антителами-ингибиторами контрольных точек, например, PD-1.

Аналогично, было показано, что TIGIT также имеет характерные свойства рецептора контрольной точки и данное изобретение обеспечивает анти-TIGIT антитела, которые блокируют взаимодействие

и/или связывание TIGIT с PVR. Когда TIGIT связывается его лигандом (PVR), возникает ингибирующий сигнал, который действует для ослабления иммунного ответа NK- и Т-клеток против целевой клетки (то есть аналогично PD-1/PDL1). Блокирование связывания PVR с TIGIT отключает этот ингибирующий сигнал TIGIT и, как результат, модулирует иммунный ответ NK- и Т-клеток. Использование анти-TIGIT антитела, которое блокирует связывание с PVR, является терапевтическим подходом, который повышает уничтожение раковых клеток NK и Т-клетками. Были созданы блокирующие антитела, которые связывают TIGIT и блокируют связывание его лиганда, PVR. Представлены анти-TIGIT антитела в комбинации с другими антителами-ингибиторами контрольной точки, например, PD-1.

Кроме того, изобретение обеспечивает комбинации анти-PVRIG антител и анти-TIGIT для применения в лечении рака.

В. Определения

Для того, чтобы можно было в более полной мере понять данную заявку, ниже изложены несколько определений. Такие определения предназначены для охвата грамматических эквивалентов.

"Абляция" в данном документе означает снижение или исключение активности. В некоторых вариантах осуществления полезно удалить активность из константных доменов антител. Так, например, "абляция связывания Fc γ R" означает, что аминокислотный вариант Fc-области имеет менее 50% исходного связывания по сравнению с Fc-областью, не содержащей специфический вариант, предпочтительно с менее чем 70-80-90-95-98% потерей активности, и в целом с активностью ниже уровня выявляемого связывания при анализе Biacore. Как изображено на фиг. 50, один вариант абляции в константной области IgG1 представляет собой вариант N297A, который удаляет нативный сайт гликозилирования и значительно уменьшает связывание Fc γ RIIIa и, таким образом, уменьшает антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (АЗКЦ).

Под "антигенсвязывающим доменом" или "ABD" в данном документе подразумевается набор из шести определяющих комплементарность областей (Complementary Determining Region) (CDR), которые, когда они присутствуют как часть полипептидной последовательности, специфически связывают целевой антиген, как обсуждалось в данном документе. Таким образом, "антигенсвязывающий домен TIGIT" связывает антиген TIGIT (последовательность которого изображена на фиг. 51), как описано в данном документе. Аналогично, "связывающий домен антитела к PVRIG" связывает антиген PVRIG (последовательность которого изображена на фиг. 1), как описано в данном документе. Как известно в данной области техники, эти CDR обычно присутствуют в виде первого набора CDR варибельной области тяжелой цепи (vhCDR или V_H CDR) и второго набора CDR варибельной области легкой цепи (VLCDR или V_LCDR), каждый из которых содержит три CDR: vhCDR1, vhCDR2, vhCDR3 для тяжелой цепи и VICDR1, VLCDR2 и VLCDR3 для легкой цепи. CDR присутствуют в доменах варибельной области тяжелой цепи и варибельной области легкой цепи, соответственно, и вместе образуют Fv-область. Таким образом, в некоторых случаях шесть CDR антигенсвязывающего домена вносятся посредством варибельной области тяжелой и варибельной области легкой цепи. В формате "Fab" набор из 6 CDR дополненный двумя различными полипептидными последовательностями, доменом варибельной области тяжелой цепи (vh или V_H, содержащим vhCDR1, vhCDR2 и vhCDR3) и доменом варибельной области легкой цепи (vl или V_L, содержащим VICDR1, VLCDR2 и VLCDR3), причем C-конец vh-домена присоединен к N-концу домена CH1 тяжелой цепи, а C-конец vl-домена присоединен к N-концу (и тем самым образует легкую цепь).

"Модификация" в данном документе означает аминокислотную замену, инсерцию и/или делецию в полипептидной последовательности или изменение фрагмента, химически связанного с белком. Например, модификация может быть проведена изменением углевода или ПЭГ-структуры, присоединенной к белку. "Аминокислотная модификация" в данном документе означает аминокислотную замену, инсерцию и/или делецию в полипептидной последовательности. Для ясности, если не указано иное, аминокислотная модификация всегда относится к аминокислоте, которая кодируется ДНК, например, 20 аминокислот, которые имеют кодоны в ДНК и РНК.

"Аминокислотная замена" или "замена" в данном документе означает замену аминокислоты в конкретном положении в первичной полипептидной последовательности другой аминокислотой. В частности, в некоторых вариантах реализации изобретения замена представляет собой аминокислоту, которая не встречается в природе в конкретном положении, не встречается в природе ни в данном организме, ни в каком-либо организме. Например, замена N297A относится к вариантному полипептиду, в случае которой Fc-вариант, в котором глутаминовая кислота находится в положении 297, заменяется тирозином. Для ясности, белок, который сконструирован для изменения кодирующей нуклеотидной последовательности, но без изменения исходной аминокислоты (например, изменение CGG (кодирующий аргинин) на CGA (также кодирующий аргинин) для увеличения уровней экспрессии в организме-хозяине), не является белком с "аминокислотной заменой"; а именно, несмотря на создание нового гена, кодирующего такой же белок, если белок имеет такую же аминокислоту в конкретном положении, с которого он начинается, то это не аминокислотная замена.

Под "вставкой аминокислоты" или "инсерцией", как используется в данном документе, подразумевают добавление аминокислотной последовательности в определенном положении в исходной полипеп-

тидной последовательности. Например, -233E или 233E обозначает введение глутаминовой кислоты после положения 233 и до положения 234. Кроме того, -233ADE или A233ADE обозначает вставку AlaAspGlu после положения 233 и до положения 234.

Под "делецией аминокислоты" или "делецией", как используется в данном документе, подразумевают удаление аминокислотной последовательности в определенном положении в исходной полипептидной последовательности. Например, E233- или E233#, E233() или E233del обозначает делецию глутаминовой кислоты в положении 233. Кроме того, EDA233- или EDA233# обозначает удаление последовательности GluAspAla, которая начинается в положении 233.

Под "вариантным белком" или "вариантом белка" или "вариантом", как используется в данном документе, подразумевается белок, который отличается от белка исходного белка в силу по меньшей мере одной модификации аминокислоты. Вариант белка может относиться к самому белку, композиции, содержащей белок, или к аминокислотной последовательности, которая его кодирует. Предпочтительно, чтобы вариант белка имел по меньшей мере одну аминокислотную модификацию по сравнению с исходным белком, например, от около одной до около семидесяти аминокислотных модификаций, и предпочтительно от около одной до около пяти аминокислотных модификаций по сравнению с исходным. Как описано ниже, в некоторых вариантах осуществления исходный полипептид, например исходный Fc-полипептид, представляет собой последовательность человека дикого типа, такую как Fc-область из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, хотя человеческие последовательности с вариантами также могут служить в качестве исходных полипептидов. Последовательность варианта белка в данном документе предпочтительно будет обладать по меньшей мере около 80% идентичности с последовательностью исходного белка и предпочтительнее всего по меньшей мере около 90% идентичности, предпочтительнее по меньшей мере около 95-98-99% идентичности. Вариантный белок может относиться к самому вариантному белку, композициям, содержащим вариант белка, или последовательности ДНК, которая его кодирует. Соответственно "вариант антитела" или "вариантное антитело" в данном документе означает антитело, которое отличается от исходного антитела благодаря по меньшей мере одной аминокислотной модификации, "вариант IgG" или "вариантный IgG" в данном документе означает антитело, которое отличается от исходного IgG (снова, во многих случаях, от последовательности IgG человека) благодаря по меньшей мере одной аминокислотной модификации, и "вариант иммуноглобулина" или "вариантный иммуноглобулин" в данном документе означает иммуноглобулиновую последовательность, которая отличается от такой последовательности исходного иммуноглобулина благодаря по меньшей мере одной аминокислотной модификации. "Fc-вариант" или "вариантный Fc" в данном документе означает белок, содержащий аминокислотную модификацию в домене Fc. Fc-варианты согласно данному изобретению определяют в соответствии с аминокислотными модификациями, которые их составляют. Так, например, S241P или S228P представляет собой шарнирный вариант с замененным пролином в положении 228 относительно исходного шарнирного полипептида IgG4, причем нумерация S228P соответствует индексу ЕС, а S241P соответствует нумерации Кабата. Индекс ЕС, или ЕС-индекс, как в схеме нумерации Кабата, или ЕС, относится к нумерации антитела ЕС (Edelman et al., 1969, Proc Natl Acad Sci USA 63:78-85, в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки). Модификация может быть добавлением, делецией или заменой. Замены могут включать природные аминокислоты и, в некоторых случаях, синтетические аминокислоты. Примеры включают патенты США № 6586207; WO 98/48032; WO 03/073238; US2004-0214988A1; WO 05/35727A2; WO 05/74524A2; J. W. Chin et al., (2002), Journal of the American Chemical Society 124: 9026-9027; J. W. Chin, & PG Schultz, (2002), ChemBioChem 11: 1135-1137; J. W. Chin, et al., (2002), PICAS United States of America 99:11020-11024; и L. Wang, & P. G. Schultz, (2002), Chem. 1-10, все включены в полном объеме посредством ссылки.

В данном документе "белок" означает по меньшей мере две ковалентно присоединенные аминокислоты, которые включают белки, полипептиды, олигопептиды и пептиды. Пептидная группа может содержать природные аминокислоты и пептидные связи или синтетические пептидомиметические структуры, т.е. "аналоги", такие как пептоиды (см. Simon et al., PNAS USA 89 (20): 9367 (1992), полностью включенную посредством ссылки). Аминокислоты могут быть или природными, или синтетическими (например, не являются аминокислотой, кодируемой ДНК); как будет понятно специалистам в данной области техники. Например, для целей данного изобретения гомофенилаланин, цитруллин, орнитин и норлейцин считаются синтетическими аминокислотами и могут использоваться обе D- и L-(R или S) конфигурации аминокислот. Варианты согласно данному изобретению могут содержать модификации, которые включают использование синтетических аминокислот, включенных с использованием, например, технологий, разработанных Шульцем и его коллегами, включая, но не ограничиваясь способами, описанными в Cropp & Shultz, 2004, Trends Genet. 20(12): 625-30, Anderson et al., 2004, Proc Natl Acad Sci USA 101 (2):7566-71, Zhang et al., 2003, 303(5656):371-3, and Chin et al., 2003, Science 301(5635):964-7, все включены в полном объеме посредством ссылки. Кроме того, полипептиды могут включать синтетическую дериватизацию одной или более боковых цепей или концов, гликозилирование, пегилирование, циклическую перестановку, циклизацию, линкеры с другими молекулами, слияние с белками или белковыми доменами и добавление пептидных меток или маркеров.

"Остаток" в данном документе означает положение в белке и связанную с ним аминокислотную

идентичность. Например, аспарагин 297 (также называемый Asn297 или N297) представляет собой остаток в положении 297 в человеческом антителе IgG1.

"Fab" или "Fab-участок" в данном документе означает полипептид, который содержит иммуноглобулиновые домены VH, CH1, VL и CL. Fab может относиться к этой области отдельно или к этой области в контексте полноразмерного антитела или фрагмента антитела.

Под "Fv" или "фрагментом Fv" или "областью Fv", как используется в данном документе, подразумевают полипептид, который содержит V_L- и V_H- домены одного антитела. Как будет понятно специалистам в данной области, они обычно состоят из двух цепей.

Под "одноцепочечным Fv" или "scFv" в данном документе подразумевают вариабельный домен тяжелой цепи (V_H), ковалентно связанный с вариабельным доменом легкой цепи (V_L), как правило, с использованием scFv-линкера, как обсуждалось в данном документе, с образованием scFv или домена scFv. Домен scFv может быть в любой ориентации от N- до C-конца (V_H-линкер-V_L или V_L-линкер-V_H). В общем, линкер является scFv-линкером, как общеизвестно в данной области. Тетные остатки: хники, причем линкерный пептид преимущественно содержит следующие аминокислоты Gly, Ser, Ala или Thr. Линкерный пептид должен иметь длину, достаточную для связывания двух молекул таким образом, чтобы они принимали правильную конформацию относительно друг друга, чтобы сохранить желаемую активность. В одном варианте осуществления линкер имеет от около 1 до 50 аминокислот в длину, предпочтительно от 1 до 30 аминокислот в длину. В одном варианте осуществления могут быть использованы линкеры длиной от 1 до 20 аминокислот, причем в некоторых вариантах осуществления используют от около 5 до около 10 аминокислот. Пригодные линкеры включают полимеры глицина-серина, включающие, например, (GS)_n, (GS₂GS)_n, (GGGS)_n и (GGGS)_n, где n представляет собой целое число, по меньшей мере единицу (и в целом, как правило, от 3 до 4), полимеры глицина-аланина, полимеры аланина-серина и другие гибкие линкеры. В альтернативном варианте могут находить применение как линкеры множества небелковых полимеров, включающих, но не ограниченных этим, полиэтиленгликоль (ПЭГ), полипропиленгликоль, полиоксипропилены или сополимеры полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля, которые могут находить применение в качестве линкеров.

Под "модификацией подкласса IgG" или "модификацией изотипа", как используется в данном документе, понимается аминокислотная модификация, которая превращает одну аминокислоту одного изотипа IgG в соответствующую аминокислоту другого, выровненного изотипа IgG. Например, поскольку IgG1 содержит тирозин, а IgG2 - фенилаланин в положении EC 296, то замена F296Y в IgG2 считается модификацией подкласса IgG. Аналогично, поскольку IgG1 имеет пролин в положении 241, а IgG4 имеет серию, молекула IgG4 с S241P считается модификацией подкласса IgG. Следует отметить, что модификации подкласса считаются аминокислотными заменами в данном документе.

Под "неприродной модификацией", как используется в данном документе, понимается модификация аминокислоты, которая не является изотипической. Например, поскольку ни один из IgG не содержит аспарагин AN в положении 297, замена N297A в IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 (или их гибридах) считается неприродной модификацией.

"Аминокислота" или "аминокислотная единица" в данном документе означает одну из 20 встречающихся в природе аминокислот, которые кодируются ДНК или РНК.

"Эффекторная функция" в данном документе означает биохимическое событие, которое происходит в результате взаимодействия Fc-области антитела с рецептором или лигандом Fc. Эффекторные функции включают, но не ограничиваются ими, АЗКЦ, АЗКФ и КЗЦ.

"Fc-лиганд IgG" в данном документе означает молекулу, предпочтительно полипептид, полученный из любого организма, которая связывается с Fc-областью антитела IgG с образованием Fc/Fc-лигандного комплекса. Fc-лиганды включают, но не ограничиваются ими, FcγRI, FcγRII, FcγRIII, FcRn, Clq, C3, маннансвязывающий лектин, рецептор маннозы, стафилококковый белок А, стрептококковый белок G и вирусный FcγR. Fc-лиганды также включают гомологи рецепторов Fc (FcRH), представляющие собой семейство рецепторов Fc, которые гомологичны FcγR (Davis et al., 2002, Immunological Reviews 190:123-136, включена в полном объеме посредством ссылки). Fc-лиганды могут включать неоткрытые молекулы, которые связывают Fc. Конкретными Fc-лигандами IgG являются FcRn (неонатальный Fc-рецептор) и Fc- гамма рецепторы. "Fc-лиганд" в данном документе означает молекулу, предпочтительно полипептид, полученный из любого организма, который связывается с Fc-областью антитела с образованием Fc/Fc-лигандного комплекса.

"Исходный полипептид" в данном документе означает исходный полипептид, который впоследствии модифицируется для получения варианта. Исходный полипептид может быть встречающимся в природе полипептидом, или вариантом, или сконструированной версией встречающегося в природе полипептида. Исходный полипептид может относиться к самому полипептиду, композициям, которые содержат исходный полипептид, или аминокислотной последовательности, которая кодирует его. Соответственно "исходный иммуноглобулин" в данном документе означает немодифицированный полипептид иммуноглобулина, который модифицируется для получения варианта, а "исходное антитело" в данном документе означает немодифицированное антитело, которое модифицируется для получения вариантно-

го антитела. Следует отметить, что "исходное антитело" включает известные коммерческие, полученные рекомбинантным способом антитела, как описано ниже.

"Fc", или "Fc-область", или "Fc-домен" в данном документе означает полипептид, содержащий константную область антитела, за исключением первого домена константной области иммуноглобулина, и, в некоторых случаях, часть шарнира. Таким образом, Fc относится к последним двум доменам константных областей иммуноглобулинов IgA, IgD и IgG, последним трем доменам константных областей иммуноглобулинов IgE и IgM, и к гибкому шарниру N-конца у этих доменов. Для IgA и IgM Fc может содержать J-цепь. Для IgG Fc-домен содержит домены иммуноглобулина C γ 2 и C γ 3 (C γ 2 и C γ 3) и нижнюю шарнирную область между C γ 1 (C γ 1) и C γ 2 (C γ 2). Хотя границы Fc-области могут изменяться, Fc-область тяжелой цепи человеческого IgG обычно определяется как содержащая остатки C226 или P230 на ее карбоксильном конце, причем нумерация проводится в соответствии с индексом ЕС, как и в Кабат. В некоторых вариантах осуществления, как более полно описано ниже, модификации аминокислот производятся в Fc-области, например, для изменения связывания с одним или более рецепторами Fc γ R или с рецептором FcRn.

Под "константной областью тяжелой цепи" в данном документе подразумевается CH1-шарнир-CH2-CH3 часть антитела.

Под "положением", как используется в данном документе, подразумевают локализацию в последовательности белка. Положения могут быть пронумерованы последовательно или в соответствии с установленным форматом, например, индексом ЕС для нумерации антител.

Под "целевым антигеном", как используется в данном документе, подразумевают молекулу, которая специфически связана с вариабельной областью данного антитела. В данном случае один целевой антиген, представляющий интерес в данном документе, представляет собой TIGIT, обычно TIGIT человека и необязательно TIGIT яванского макака, как определено ниже. Другим целевым антигеном, представляющим интерес, является PVRIG, обычно PVRIG человека и, необязательно PVRIG яванского макака, как определено ниже.

Под "целевой клеткой", как используется в данном документе, подразумевают клетку, которая экспрессирует целевой антиген.

Под "вариабельной областью", как используется в данном документе, подразумевают область иммуноглобулина, которая содержит один или более доменов Ig, которые, по существу, кодируются любым из генов V κ , V λ , V μ и/или V δ , которые формируют генетические локусы каппа, лямбда и тяжелой цепи иммуноглобулина, соответственно.

"Дикий тип или ДТ" в данном документе означает аминокислотную последовательность или нуклеотидную последовательность, которая обнаружена в природе, включая аллельные вариации. Белок ДТ имеет аминокислотную последовательность или нуклеотидную последовательность, которая не была намеренно модифицирована.

Антитела согласно данному изобретению обычно являются выделенными или рекомбинантными. "Выделенный" при этом используется для описания различных полипептидов, описанных в данном документе, обозначает полипептид, который идентифицирован и отделен и/или выделен из клетки или клеточной культуры, в которой он был экспрессирован. Как правило, выделенный полипептид будет получен с использованием по меньшей мере одной стадии очистки. "Выделенное антитело" относится к антителу, которое практически свободно от других антител, имеющих разные антигенные специфичности. "Рекомбинантный" означает, что антитела генерируются с использованием методов рекомбинантной нуклеиновой кислоты в экзогенных клетках-хозяевах.

"Специфическое связывание", или "специфически связывается с", или является "специфическим к" конкретному антигену или эпитопу, означает связывание, которое измеряемо отличается от неспецифического взаимодействия. Специфическое связывание может измеряться, к примеру, определением связывания молекулы по сравнению со связыванием контрольной молекулы, которая обычно представляет собой молекулу со сходной структурой, которая не имеет активности связывания. Например, специфическое связывание может определяться конкуренцией с контрольной молекулой, которая сходна с мишенью.

Специфическое связывание для конкретного антигена или эпитопа может быть проявлено, например, антителом, имеющим KD для антигена или эпитопа по меньшей мере около 10^{-9} M, по меньшей мере около 10^{-10} M, по меньшей мере около 10^{-11} M, по меньшей мере около 10^{-12} M, по меньшей мере около 10^{-13} M, по меньшей мере около 10^{-14} M, по меньшей мере около 10^{-15} M, где KD относится к скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Как правило, антитело, которое специфически связывает антиген, будет иметь KD, которое в 20, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000 или более раз для контрольной молекулы относительно антигена или эпитопа.

Также может проявляться специфическое связывание конкретного антигена или эпитопа, например, антителом, имеющим KA или Ka для антигена или эпитопа по меньшей мере в 20, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000 или еще больше раз для эпитопа относительно контроля, где KA или Ka относится к скорости ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Аффинность связывания обычно измеря-

ется с использованием поверхностного плазмонного резонанса (например, анализ Biacore) и проточной цитометрии с антигенэкспрессирующими клетками.

С. Последовательности

Перечень последовательностей содержит ряд последовательностей на основе формата с Фиг. 53; На фиг. 4 приведена USSN 62/513916 явно включенная посредством ссылки в данный документ) в качестве руководства по маркировке последовательностей. Вариабельный домен тяжелой цепи помечен идентификатором (например, "CPA.0.86") со следующей последовательностью, следующей за форматом на фиг. 53 данной спецификации (идентичной формату с фиг. 4, упомянутому выше), в которой следующий идентификатор последовательности относится к *vhCDR1*, следующий к *vhCDR2*, с *vhCDR3*, полноразмерной тяжелой цепи, вариабельного домена легкой цепи, *VLCDR1*, *VLCDR2*, *VLCDR3* и полноразмерной легкой цепи. Таким образом, отдельное антитело имеет 10 ассоциированных идентификаторов последовательности.). В перечень последовательностей входят последовательности IgG1 мыши BM26 (BM26-M1) (WO 2016/028656A1, клон 31C6) и IgG1 мыши BM29 (BM29-M1) (US 2016/0176963A1, клон 22G2). Если не указано, полноразмерные последовательности HC антител к TIGIT находятся в формате H4 (S241P).

Д. Белки PVRIG

Данное изобретение относится к антителам, которые специфически связываются с белками PVRIG и предотвращают активацию его лигандным белком PVRL2, гликопротеином плазматической мембраны человека. PVRIG, также называемый белком, связанным с рецептором вируса полиомиелита, содержащим иммуноглобулиновый домен, Q6DKI7 или C7orf15, относится к аминокислотным и нуклеотидным последовательностям, указанным в идентификаторе присоединения RefSeq NP_076975, изображенном На фиг. 1. Последовательность белка 2, связанного с человеческим рецептором вируса полиомиелита, (PVLR2, также известный как нектин-2, CD112 или медиатор входа вируса герпеса В (HVEB), партнера по связыванию PVRIG (как показано в примере 5 публикации US 2016/0244521) изображена на фиг. 2. Антитела согласно изобретению специфичны для внеклеточного домена PVRIG, так что связывание PVRIG и PVLR2 блокируется.

PVRIG представляет собой трансмембранный доменный белок длиной 326 аминокислот с сигнальным пептидом (простирающийся от аминокислоты 1 до 40), внеклеточный домен (простирающийся от аминокислоты 41 до 171), трансмембранный домен (простирающийся от аминокислоты 172 до 190) и цитоплазматический домен (простирающийся от аминокислоты 191 до 326). Существует два метионина, которые могут быть иницирующими кодонами, но зрелые белки являются идентичными.

Соответственно, как используется в данном документе, термин "PVRIG" или "белок PVRIG" или "полипептид PVRIG" может необязательно включать любой такой белок или его варианты, конъюгаты или их фрагменты, включая, но не ограничиваясь ими, известный или PVRIG дикого типа, как описано в данном документе, а также любые возможные природные варианты сплайсинга, варианты аминокислот или изоформы и, в частности, фрагмент ВКД PVRIG.

Как отмечено в данном документе и более подробно описано ниже, анти-PVRIG антитела (включая антигенсвязывающие фрагменты), которые связываются как с PVRIG, так и предотвращают активацию PVRL2 (например, чаще всего путем блокирования взаимодействия PVRIG и PVLR2), используются для усиления активации Т-клеток и/или НК-клеток и могут использоваться для лечения таких заболеваний, как рак и патогенная инфекция.

Е. Белки TIGIT

Данное изобретение относится к антителам, которые специфически связываются с белками TIGIT и предотвращают активацию его лигандным белком, PVR, рецептором вируса полиомиелита (иначе CD 155), гликопротеином плазматической мембраны человека. TIGIT или Т-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и ITIM является коингибиторным белком-рецептором, также известным как WUCAM, Vstm3 или Vsig9. TIGIT имеет вариабельный домен иммуноглобулина, трансмембранный домен и иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий мотив (ITIM) и содержит элементы сигнатурной последовательности семейства белков PVR. Последовательности внеклеточного домена (ВКД) TIGIT и PVR изображены на фиг. 51. Антитела согласно изобретению специфичны для ВКД TIGIT, так что связывание TIGIT и PVR блокируется.

Соответственно, как используется в данном документе, термин "TIGIT" или "белок TIGIT" или "полипептид TIGIT" может необязательно включать любой такой белок или его варианты, конъюгаты или их фрагменты, включая, но не ограничиваясь ими, известный или TIGIT дикого типа, как описано в данном документе, а также любые возможные природные варианты сплайсинга, варианты аминокислот или изоформы и, в частности, фрагмент ВКД TIGIT.

Как отмечено в данном документе и более подробно описано ниже, анти-TIGIT антитела (включая антигенсвязывающие фрагменты), которые связываются как с TIGIT, так и предотвращают активацию PVR (например, чаще всего путем блокирования взаимодействия TIGIT и PVR), используются для усиления активации Т-клеток и/или НК-клеток и могут использоваться для лечения таких заболеваний, как рак и патогенная инфекция.

VI. Антитела

Как обсуждается ниже, термин "антитело" используется в общем смысле. Структурные единицы стандартного антитела обычно содержат тетрамер. Каждый тетрамер, как правило, состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, каждая пара имеет одну "легкую" (обычно имеющую молекулярную массу около 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (обычно имеющую молекулярную массу около 50-70 кДа). Легкие цепи человека классифицируют как легкие цепи каппа и лямбда. Данное изобретение относится к моноклональным антителам, которые обычно основаны на классе IgG, который имеет несколько подклассов, включая, но не ограничиваясь ими, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В общем, IgG1, IgG2 и IgG4 используются чаще, чем IgG3. Следует отметить, что IgG1 имеет разные аллотипы с полиморфизмами в позициях 356 (D или E) и 358 (L или M). Приведенные в данном документе последовательности используют аллотип 356D/358M, однако в данный документ включен другой аллотип. То есть любая последовательность, содержащая Fc-домен IgG1, включенный в данный документ, может иметь 356E/358L, заменяющий аллотип 356D/358M.

Аминоконцевая часть каждой цепи содержит вариабельную область от около 100 до 110 или более аминокислот, главным образом ответственную за распознавание антигена, обычно называемую в данной области техники и в данном документе "Fv-доменом" или "Fv-областью". В вариабельной области для каждого из V-доменов тяжелой цепи и легкой цепи собраны три петли для образования антигенсвязывающего сайта. Каждая из петель упоминается как определяющая комплементарность область (далее называемая "CDR"), в которой изменение аминокислотной последовательности является наиболее значительным. "Вариабельный" относится к тому факту, что среди антител определенные сегменты вариабельной области значительно отличаются по последовательностям. Вариабельность в пределах вариабельной области распределяется неравномерно. На самом деле, V-области состоят из относительно инвариантных фрагментов, называемых каркасными областями (FR), из 15-30 аминокислот, разделенных более короткими областями с чрезвычайной вариабельностью, называемыми "гипервариабельными областями", длиной каждая 9-15 аминокислот или длиннее.

Каждый VH и VL состоит из трех гипервариабельных областей ("определяющие комплементарность области", "CDR") и четырех FR, расположенных от N-конца до C-конца в следующем порядке: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4.

Гипервариабельная область обычно охватывает аминокислотные остатки от около 24-34 аминокислотных остатков (LCDR1, "L" обозначает легкую цепь), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3) в вариабельной области легкой цепи и около 31-35B (HCDR1; "H" обозначает тяжелую цепь), 50-65 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3) в вариабельной области тяжелой цепи; Kabat et al, SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) и/или эти остатки, образующие гипервариабельную петлю (например, остатки 26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2) и 91-96 (LCDR3) в вариабельной области легкой цепи и 26-32 (HCDR1), 53-55 (HCDR2) и 96-101 (HCDR3) в вариабельной области тяжелой цепи, Chothia and Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917. Конкретные CDR согласно изобретению описаны ниже.

Как будет понятно специалистам в данной области техники, точная нумерация и размещение CDR могут отличаться среди различных систем нумерации. Однако следует понимать, что описание последовательностей вариабельной области тяжелой цепи и/или вариабельной области легкой цепи включает описание связанных (характерных) CDR. Соответственно описание каждой вариабельной области тяжелой цепи представляет собой описание vhCDR (например, vhCDR1, vhCDR2 и vhCDR3), и описание каждой вариабельной области легкой цепи представляет собой описание vlCDR (например, vlCDR1, vlCDR2 и vlCDR3). Полезное сравнение нумерации CDR приведено ниже, см. Lafranc et al., Dev. Contr. Immunol. 27(1):55-77 (2003):

	Кабат+Чотиа	IMGT	Кабат	AbM	Чотиа	Контакт
vhCDR1	26-35	27-38	31-35	26-35	26-32	30-35
vhCDR2	50-65	56-65	50-65	50-58	53-55	47-58
vhCDR3	95-102	105-117	95-102	95-102	96-101	93-101
vlCDR1	24-34	27-38	24-34	24-34	26-32	30-36
vlCDR2	50-56	56-65	50-56	50-56	50-52	46-55
vlCDR3	89-97	105-117	89-97	89-97	91-96	89-96

В данном описании система нумерации по Кабат обычно используется для обозначения остатка в вариабельной области (приблизительно, остатки 1-107 вариабельной области легкой цепи и остатки 1-113 вариабельной области тяжелой цепи), и шарнир и система нумерации ЕС для Fc-областей (например, Kabat et al., supra (1991)).

Данное изобретение обеспечивает большое количество различных наборов CDR. В этом случае "полный набор CDR" содержит три вариабельные области легкой цепи и три вариабельные области тяжелой цепи CDR, например, vlCDR1, vlCDR2, vlCDR3, vhCDR1, vhCDR2 и vhCDR3. Они могут быть частью большего вариабельного домена легкой цепи или вариабельного домена тяжелой цепи, соответственно. Кроме того, как более подробно описано в данном документе, вариабельные домены тяжелой и легкой цепей могут быть на отдельных полипептидных цепях, когда используется тяжелая и легкая цепь, или на одной полипептидной цепи в случае последовательностей scFv.

CDR способствуют образованию антигенсвязывающего или, более конкретно, эпитопсвязывающего сайта антител. "Эпитоп" относится к детерминанте, которая взаимодействует со специфическим антигенсвязывающим сайтом в варибельной области молекулы антитела, известной как паратоп. Эпитопы группируются из молекул, таких как аминокислоты или сахаридные боковые цепи, и обычно имеют специфические структурные характеристики, а также специфические характеристики заряда. Один антиген может иметь более чем один эпитоп.

Эпитоп может содержать аминокислотные остатки, непосредственно участвующие в связывании (также названные иммунодоминантным компонентом эпитопа), и другие аминокислотные остатки, которые непосредственно не участвуют в связывании, такие как аминокислотные остатки, которые эффективно блокируются специфическим антигенсвязывающим пептидом; другими словами, аминокислотный остаток находится в пределах зоны узнавания специфического антигенсвязывающего пептида.

Эпитопы могут быть как конформационными, так и линейными. Конформационный эпитоп создается пространственно совмещенными аминокислотами из разных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп представляет собой эпитоп, созданный соседними аминокислотными остатками в полипептидной цепи. Конформационные и неконформационные эпитопы могут различаться в том отношении, что в присутствии денатурирующих растворителей теряется связывание с первыми, но не с последними эпитопами.

Эпитоп обычно содержит по меньшей мере 3, а более обычно - по меньшей мере 5 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Антитела, которые распознают одинаковый эпитоп, могут быть проверены простым иммуноанализом, например, "сортировкой", демонстрирующей способность одного антитела блокировать связывание другого антитела с целевым антигеном. Как указано ниже, изобретение включает не только перечисленные в данном документе антигенсвязывающие домены и антитела, но и те, которые конкурируют за связывание с эпитопами, связанными с перечисленными антигенсвязывающими доменами.

Карбоксиконцевая часть каждой цепи определяет константную область, в основном ответственную за эффекторную функцию. Kabat et al. собрали многочисленные первичные последовательности варибельных областей тяжелых цепей и легких цепей.

Основываясь на степени сохранения последовательностей, они классифицировали отдельные первичные последовательности в CDR и структуру и составили их перечень (см. SEQUENCES OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5th edition, NIH publication, No. 91-3242, E.A. Kabat et al., полностью включенной посредством ссылки).

В подклассе IgG иммуноглобулинов имеется несколько доменов иммуноглобулина в тяжелой цепи. Под "иммуноглобулином (Ig)" в данном документе понимают область иммуноглобулина, имеющую определенную третичную структуру. Предметом интереса в данном изобретении являются домены тяжелой цепи, включая константные тяжелые (CH) домены и шарнирные домены. В контексте антител IgG изотипы IgG имеют три области CH. Соответственно, домены "CH" в контексте IgG следующие: "CH1" относится к положениям 118-220 в соответствии с индексом ЕС, как в Кабате. "CH2" относится к положениям 237-340 в соответствии с индексом ЕС, как в Кабате, а "CH3" относится к положениям 341-447 в соответствии с индексом ЕС, как в Кабате.

Другим типом Ig-домена тяжелой цепи является шарнирная область. "Шарнир", или "шарнирная область", или "шарнирная область антитела", или "шарнирная область иммуноглобулина" в данном документе означает гибкий полипептид, содержащий аминокислоты между первым и вторым константными доменами антитела. Структурно CH1-домен IgG заканчивается в положении ЕС 220, а CH2-домен IgG начинается с остатка в положении ЕС 237. Таким образом, шарнир антитела для IgG в данном документе определяется как включающий положения от 221 (D221 в IgG1) до 236 (G236 в IgG1), причем нумерация соответствует индексу ЕС, как и по Кабату.

Легкая цепь обычно состоит из двух доменов, варибельной области легкой цепи (содержащие CDR легкой цепи и вместе с варибельными доменами тяжелой цепи образуют Fv-область) и константной области легкой цепи (часто называемой CL или Ск). В общем случае константный домен каппа-цепи или константный домен лямбда-цепи может быть использован, причем лямбда, как правило, находит применение в изобретении.

Другой областью интереса для дополнительных замен, описанных ниже, является Fc-область.

А. Химерные и гуманизированные антитела

В некоторых вариантах осуществления антитела в данном документе могут быть получены из смеси разных видов, например, химерного антитела и/или гуманизированного антитела. В целом, как "химерные антитела", так и "гуманизированные антитела" относятся к антителам, в которых комбинируются области из более чем одного вида. Например, "химерные антитела" традиционно содержат варибельную(е) область(и) из организма мыши (или, в некоторых случаях, крысы) и константную(ых) область(ей) из организма человека. "Гуманизированные антитела", как правило, относятся к нечеловеческим антителам, которые имеют каркасные области варибельного домена, замененные на последовательности, обнаруженные в антителах человека. Как правило, в гуманизированном антителе полное антитело, за исключением CDR, кодируется полинуклеотидом человеческого происхождения или идентично такому

антителу, за исключением его CDR. CDR, некоторые из которых или все кодируются нуклеиновыми кислотами, происходящими из нечеловеческого организма, прививают на каркас бета-листа варибельной области антитела человека для создания антитела, специфичность которого определяется привитыми CDR. Создание таких антител описано, например, в WO 92/11018, Jones, 1986, Nature 321: 522-525, Verhoeven et al., 1988, Science 239: 1534-1536, все они полностью включены посредством ссылки. "Обратная мутация" выбранных остатков акцепторного каркаса на соответствующие донорские остатки часто требуется для восстановления аффинности, которая потеряна в начальной привитой конструкции (US 5530101; US 5585089; US 5693761; US 5693762; US 6180370; US 5859205; US 5821337; US 6054297; US 6407213, все включены в полном объеме посредством ссылки). Гуманизированное антитело оптимально также будет содержать по меньшей мере часть и, как правило, все константную область иммуноглобулина, как правило, иммуноглобулина человека и, следовательно, обычно будет включать Fc-область человека. Гуманизированные антитела также могут быть получены с использованием мышей с генетически модифицированной иммунной системой. Roque et al., 2004, Biotechnol. Prog. 20: 639-654, полностью включенной посредством ссылки. Различные техники и способы гуманизации и изменения нечеловеческих антител хорошо известны в данной области техники (см. Tsurushita & Vasquez, 2004, Humanization of Monoclonal Antibodies, Molecular Biology of B Cells, 533-545, Elsevier Science (CISA) и ссылки, цитируемые в нем, все полностью включены посредством ссылки). Способы гуманизации включают, но не ограничиваются ими, способы, описанные в Jones et al., 1986, Nature 321:522-525; Riechmann et al., 1988; Nature 332:323-329; Verhoeven et al., 1988, Science, 239:1534-1536; Queen et al., 1989, Proc Natl Acad Sci, USA 86:10029-33; He et al., 1998, J. Immunol. 160: 1029-1035; Carter et al., 1992, Proc Natl Acad Sci USA 89:4285-9; Presta et al., 1997, Cancer Res. 57(20):4593-9; Gorman et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 4181-4185; O'Connor et al., 1998, Protein Eng 11: 321-8, все полностью включены посредством ссылки. Гуманизация или другие способы снижения иммуногенности варибельных областей антитела, не являющегося человеческим, могут включать способы изменения поверхности, как описано, например, в Roguska et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 969-973, полностью включенной посредством ссылки.

Таким образом, vHCDR и VLCDR из любого из перечисленных антител в данном случае могут быть гуманизированы (или "регуманизированы" для тех, которые уже были гуманизированы).

В некоторых вариантах осуществления антитела согласно изобретению содержат варибельную область тяжелой цепи от конкретного гена иммуноглобулина тяжелой цепи зародышевой линии и/или варибельной области легкой цепи от конкретного гена иммуноглобулина легкой цепи зародышевой линии. Например, такие антитела могут содержать или состоять из человеческого антитела, содержащего варибельные области тяжелой или легкой цепи, которые являются "продуктом" или "производными от" конкретной последовательности зародышевой линии. Человеческое антитело, которое является "продуктом" или "производным от" последовательности иммуноглобулина зародышевой линии человека, можно идентифицировать как таковое, сравнивая аминокислотную последовательность человеческого антитела с аминокислотными последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии человека и выбирая иммуноглобулин зародышевой линии человека последовательность, наиболее близкую в последовательности (то есть наибольший процент идентичности) к последовательности человеческого антитела. Человеческое антитело, которое является "продуктом" или "производным от" конкретной последовательности иммуноглобулина зародышевой линии человека, может содержать аминокислотные различия по сравнению с последовательностью зародышевой линии, например, из-за природных соматических мутаций или преднамеренного введения сайтнаправленной мутации. Однако гуманизированное антитело по меньшей мере на 90% идентично по аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, кодируемой геном иммуноглобулина зародышевой линии человека, и содержит аминокислотные остатки, которые идентифицируют антитело как производное от человеческих последовательностей по сравнению с аминокислотными последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии других видов (например, последовательности зародышей линии мыши). В некоторых случаях гуманизированное антитело может составлять по меньшей мере 95, 96, 97, 98 или 99% или даже по меньшей мере 96, 97, 98 или 99% идентичности в аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, кодируемой геном иммуноглобулина зародышевой линии, исключая CDR. Таким образом, CDR могут быть мышинными, но каркасные области варибельной области (тяжелой или легкой) могут быть по меньшей мере на 96, 97, 98 или 99% идентичны в аминокислотной последовательности к аминокислотам каркасной области, кодируемой одним геном иммуноглобулина зародышевой линии человека.

Как правило, гуманизированное антитело, полученное из конкретной последовательности зародышевой линии человека, будет отображать не более 10-20 аминокислотных отличий от аминокислотной последовательности, кодируемой геном иммуноглобулина человеческой линии зародышевой линии. В некоторых случаях гуманизированное антитело может продемонстрировать не более 5 или даже не более 4, 3, 2 или 1 разницы аминокислот от аминокислотной последовательности, кодируемой геном иммуноглобулина зародышевой линии (опять же, до введения любого варианта, то есть число вариантов, как правило, невелико).

В одном варианте осуществления исходное антитело имеет созревшую аффинность, как известно в данной области техники. Для гуманизации и созревания аффинности могут быть применены способы,

основанные на изменении структуры, например, как описано в USSN 11/004590. Способы селекции могут быть использованы для гуманизации и/или созревания аффинности переменных областей антитела, включая, но не ограничиваясь ими, методы, описанные в Wu et al, 1999, J. Mol. Biol. 294:151-162; Baca et al., 1997, J. Biol. Chem. 272(16): 10678-10684; Rosok et al., 1996, J. Biol. Chem. 271(37): 22611-22618; Rader et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 8910-8915; Krauss et al., 2003, Protein Engineering 16(10):753-759, все полностью включены посредством ссылки. Другие способы гуманизации могут включать трансплантацию только частей CDR, включая, но не ограничиваясь ими, способы, описанные в USSN 09/810,510; Tan et al., 2002, J. Immunol. 169:1119-1125; De Pascalis et al., 2002, J. Immunol. 169: 3076-3084, все полностью включены посредством ссылки.

В. Необязательные модификации антител

Антитела согласно изобретению могут быть модифицированы или сконструированы для изменения аминокислотных последовательностей путем аминокислотных замен. Как обсуждалось в данном документе, аминокислотные замены могут быть сделаны для изменения аффинности CDR к белку (например, TIGIT или PVRIG, включая как увеличение, так и уменьшение связывания), а также для изменения дополнительных функциональных свойств антител. Например, антитела могут быть модифицированы так, чтобы содержать модификации в пределах Fc-области, как правило, для изменения одного или более функциональных свойств антитела, таких как время полужизни в сыворотке крови, связывание комплемента, связывание Fc-рецептора и/или антиген-зависимая клеточная цитотоксичность. Кроме того, антитело в соответствии с по меньшей мере некоторыми вариантами осуществления изобретения может быть химически модифицировано (например, один или более химических фрагментов могут быть присоединены к антителу) или может быть модифицировано для изменения его гликозилирования, снова для изменения одного или более функциональных свойств антитела. Такие варианты осуществления описаны ниже. Нумерация остатков в Fc-области относится к индексу ЕС по Кабату.

В одном варианте осуществления шарнирная область C_{H1} модифицирована так, что количество остатков цистеина в шарнирной области изменяется, например, увеличивается или уменьшается. Данный подход описан далее в патенте США 5677425 от Bodmer et al. Количество цистеиновых остатков в шарнирной области C_{H1} изменяется, например, для облегчения сборки легкой и тяжелой цепей или для увеличения, или уменьшения стабильности антитела.

В еще одном варианте осуществления антитело может быть модифицировано для отмены обмена Fab-плеча *in vivo*, в частности, когда используются константные домены IgG4. В частности, этот процесс включает обмен полумолекулами IgG4 (одной тяжелой цепи плюс одной легкой цепи) между другими антителами IgG4, которые эффективно приводят к биспецифическим антителам, которые функционально моновалентны. Мутации в шарнирной области и константных областях тяжелой цепи могут подавлять этот обмен (см. Aalberse, RC, Schuurman J., 2002, Immunology 105: 9-19). Как указано в данном документе, мутацией, которая находит конкретное применение в данном изобретении, является S241P в контексте константного домена IgG4. IgG4 находит применение в данном изобретении, поскольку он не имеет значительной эффекторной функции и поэтому используется для блокирования связывания рецептора с его лигандом без истощения клеток (например, PVRIG с PVRL2 или TIGIT с PVR).

В некоторых вариантах осуществления аминокислотные замены могут быть сделаны в Fc-области, как правило, для изменения связывания с FcγR-рецепторами. Термин "Fc-гамма рецептор", "FcγR" или "FcγR", как используется в данном документе, означает любой член семейства белков, которые связывают Fc-область антитела IgG и кодируется геном FcγR. У людей это семейство включает, но не ограничивается ими, FcγRI (CD64), включая изоформы FcγRIa, FcγRIb и FcγRIc; FcγRII (CD32), включая изоформы FcγRIIa (включая аллотипы H131 и R131), FcγRIIb (включая FcγRIIb-1 и FcγRIIb-2) и FcγRIIc; и FcγRIII (CD16), включая изоформы FcγRIIIa (включая аллотипы V158 и F158) и FcγRIIIb (включая аллотипы FcγRIIIb-NA1 и FcγRIIIb-NA2) (Jefferis et al., 2002, Immunol Lett 82: 57-65, полностью включены посредством ссылки), а также любые неоткрытые человеческие FcγR или изоформы, или аллотипы FcγR. FcγR может быть из любого организма, включая, но не ограничиваясь ими, людей, мышей, крыс, кроликов и обезьян. Мышиные FcγR включают, но не ограничиваются ими, FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII-1 (CD16) и FcγRIII-2 (CD 16-2), а также любые неоткрытые мышиные FcγR или изоформы или аллотипы FcγR.

Существует ряд полезных замен Fc, которые могут быть сделаны для изменения связывания с одним или более FcγR-рецепторами. Замены, которые приводят к увеличению связывания, а также к уменьшению связывания, могут быть полезными. Например, известно, что повышенное связывание с FcγRIIIa обычно приводит к увеличению АЗКЦ (антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность, клеточноопосредованная реакция, в которой неспецифические цитотоксические клетки, которые экспрессируют FcγR, распознают связанное антитело в целевой клетке и впоследствии вызывают лизис целевой клетки. Аналогичным образом, снижение некоторых связей с FcγRIIb (ингибиторным рецептором) также может быть полезным при некоторых обстоятельствах. Аминокислотные замены, которые используют в данном изобретении, включают те, которые перечислены в US Sen №№ 11/124 620 (в частности, фиг. 41) и патенте США № 6737056, оба из которых полностью включены в данное описание

посредством ссылки во всей их полноте и конкретно для раскрытых в нем вариантов.

В еще одном примере Fc-область модифицирована для увеличения способности антитела опосредовать антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) и/или для увеличения аффинности антитела к Fcγ-рецептору и/или для увеличения связывания FcRn путем модификации одной или более аминокислот в следующих положениях: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 или 439. Данный подход описан далее в публикации PCT WO 00/42072 от Presta. Кроме того, были указаны сайты связывания на человеческом IgG1 для Fc1RI, FcγRII, FcγRIII и FcRn и описаны варианты с улучшенным связыванием (см. Shields, R. L. et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:6591-6604). Показано, что специфические мутации в положениях 256, 290, 298, 333, 334 и 339 улучшают связывание с FcγRIII. Кроме того, показано, что следующие комбинированные мутанты улучшают связывание FcγRIII: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A и S298A/E333A/K334A. Кроме того, мутации, такие как M252Y/S254T/T256E или M428L/N434S, улучшают связывание с FcRn и увеличивают период полувыведения антител (см. Chan CA и Carter PJ (2010) Nature Rev Immunol 10: 301-316).

Кроме того, антитела согласно изобретению модифицированы для увеличения биологического периода полувыведения. Возможны различные подходы. Например, можно ввести одну или более из следующих мутаций: T252L, T254S, T256F, как описано в патенте США № 6277375 к Ward. Альтернативно, чтобы увеличить биологический период полувыведения, антитело может быть изменено в области C_{H1} или C_L, чтобы содержать эпитоп связывания рецептора реутилизации взятый из двух петель CH2-домена Fc-области IgG, как описано в патенте США №№ 5869046 и 6121022 Presta et al. Дополнительные мутации для увеличения времени полужизни в сыворотке крови описаны в патентах США №№ 8883973, 6737056 и 7371826 и включают 428L, 434A, 434S и 428L/434S.

В еще одном варианте осуществления гликозилирование антитела модифицируется. Например, может быть получено агликозилированное антитело (т.е. антитело лишено гликозилирования). Гликозилирование может быть изменено, например, для увеличения аффинности антитела к антигену или снижения эффекторной функции, такой как АЗКЦ. Такие модификации углеводов могут быть выполнены, например, путем изменения одного или более сайтов гликозилирования в пределах последовательности антитела, например, N297. Например, может быть сделана одна или более аминокислотных замен, которые приводят к устранению одного или более сайтов гликозилирования каркасного участка вариативной области, чтобы тем самым устранить гликозилирование в этом сайте с использованием поиска замены аланина в некоторых вариантах осуществления.

Дополнительно или альтернативно может быть получено антитело, которое имеет измененный тип гликозилирования, такое как гипофукозилированное антитело, имеющее сниженные количества фукозильных остатков, или антитело, имеющее увеличенные количества структур с точками ветвления GlcNAc. Было продемонстрировано, что такие измененные образцы гликозилирования повышают способность антител к АЗКЦ. Такие модификации углеводов могут быть осуществлены, например, путем экспрессии антитела в клетке-хозяине с измененным механизмом гликозилирования. Клетки с измененным механизмом гликозилирования были описаны в данной области техники и могут быть использованы в качестве клеток-хозяев, в которых можно экспрессировать рекомбинантные антитела в соответствии с по меньшей мере некоторыми вариантами осуществления изобретения, для того чтобы получить антитело с измененным гликозилированием. См., например, публикацию патента США № 20040110704 и WO 2003/035835.

Другой модификацией антител в данном документе, которая предлагается в изобретении, является ПЭГилирование или добавление других водорастворимых фрагментов, обычно полимеров, например, для увеличения периода полувыведения. Антитело может быть ПЭГилировано, например, для увеличения биологического (например, сывороточного) периода полувыведения антитела, как известно в данной области техники.

Помимо замен, сделанных для изменения аффинности связывания с FcγRs и/или FcRn, и/или увеличения времени полужизни в сыворотке крови *in vivo*, могут быть сделаны дополнительные модификации антител, как описано более подробно ниже.

В некоторых случаях осуществляется созревание аффинности. Модификации аминокислот в CDR иногда называют "созреванием аффинности". Антитело "с созревшей аффинностью" представляет собой антитело, имеющее одно или более изменений в одном или более CDR, которые приводят к повышению аффинности антитела к антигену по сравнению с исходным антителом, не содержащим такого(их) изменения(ий). В некоторых случаях может быть желательно уменьшить аффинность антитела к его антигену.

В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислотных модификаций сделаны в одном или более CDR антител согласно изобретению (антитела к PVRIG или TIGIT). В общем, только 1 или 2, или 3 аминокислоты замещены в любом отдельном CDR и обычно не более чем от 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 9 или 10 изменений вносятся в границах набора из 6 CDR (например, vHCDR1-3 и VLCDR1-3). Однако

следует принимать во внимание, что любая комбинация замен, 1, 2 или 3 замен в любой CDR может быть независимо и необязательно комбинирована с любой другой заменой.

Созревание аффинности может быть сделано для увеличения аффинности связывания антитела с антигеном, по меньшей мере от около 10 до 50-100-150% или более, или от 1 до 5 раз по сравнению с "исходным" антителом. Предпочтительные антитела с созревшей аффинностью будут иметь наномолярную или даже пикомолярную аффинность для антигена. Антитела с созревшей аффинностью получают при помощи известных методик. Соотношение аффинности и эффективности обсуждается ниже.

Альтернативно, аминокислотные модификации могут быть сделаны в одной или более CDR антител согласно изобретению, которые являются "молчащими", например, которые существенно не изменяют аффинность антитела к антигену. Они могут быть выполнены по ряду причин, включая оптимизацию экспрессии (как это может быть сделано для нуклеиновых кислот, кодирующих антитела согласно изобретению).

Таким образом, в определение CDR и антител согласно изобретению включены варианты CDR и антител; то есть антитела согласно изобретению могут содержать аминокислотные модификации аминокислот в одной или более CDR перечисленных антител согласно изобретению. Кроме того, как указано ниже, аминокислотные модификации могут также независимо и необязательно сделаны в любой области за пределами CDR, включая каркасные и константные области.

а) Создание дополнительных антител

Дополнительные антитела к PVRIG человека могут быть выполнены, как хорошо известно в данной области техники, используя хорошо известные способы, такие как описанные в примерах. Таким образом, дополнительные анти-PVRIG антитела могут быть получены стандартными методами, такими как иммунизация мышей (иногда с использованием иммунизации ДНК, например, такими как с использованием Aldevron), с последующим скринингом против белка PVRIG человека и создания гибридомы с очисткой и восстановлением антител.

VII. Антитела к TIGIT согласно изобретению

В данном изобретении предложены анти-TIGIT антитела (для удобства "анти-TIGIT антитела" и "антитела к TIGIT" используются взаимозаменяемо). Анти-TIGIT антитела согласно изобретению специфически связываются с человеческим TIGIT и предпочтительно ВКД TIGIT человека. Изобретение дополнительно обеспечивает антигенсвязывающие домены, включая полноразмерные антитела, которые содержат ряд специфических перечислимых наборов из 6 CDR, которые связываются с TIGIT.

Специфическое связывание для TIGIT или эпитопа TIGIT может выявляться, например, при помощи антитела, имеющего K_D по меньшей мере около 10^{-4} М, по меньшей мере около 10^{-5} М, по меньшей мере около 10^{-6} М, по меньшей мере около 10^{-7} М, по меньшей мере около 10^{-8} М, по меньшей мере около 10^{-9} М, по меньшей мере около 10^{-10} М, по меньшей мере около 10^{-11} М, по меньшей мере около 10^{-12} М, по меньшей мере около 10^{-13} М, по меньшей мере около 10^{-14} М, по меньшей мере около 10^{-15} М или более, где K_D ОТНОСИТСЯ К равновесной константе диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Как правило, антитело, которое специфически связывает антиген, будет иметь K_D , которое в 20, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000 или более раз больше для контрольной молекулы по сравнению с антигеном или эпитом TIGIT.

Однако для оптимального связывания с TIGIT, экспрессируемого на поверхности NK- и Т-клеток, антитела предпочтительно имеют K_D менее 50 нМ и наиболее предпочтительно менее чем 1 нМ, при использовании менее чем 0,1 нМ и менее чем 1 пМ в способах данного изобретения

Кроме того, специфическое связывание для конкретного антигена или эпитопа может выявляться, например, при помощи антитела, имеющего k_a (со ссылкой на константу скорости ассоциации) для антигена или эпитопа TIGIT по меньшей мере в 20, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000 или более раз для эпитопа по сравнению с контролем, где k_a относится к константе скорости ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.

В некоторых вариантах осуществления анти-TIGIT антитела согласно изобретению связываются с человеческим TIGIT с K_D 100 нМ или менее, 50 нМ или менее, 10 нМ или менее, или 1 нМ или менее (то есть с более высокой аффинностью связывания), или 1 пМ или менее, причем K_D определяется известными способами, например, поверхностным плазмонным резонансом (ППР, например, анализы Biacore), ИФА (твердофазный иммуноферментный анализ), KINEXA (анализ кинетического исключения) и наиболее типично ППР при 25 или 37°C.

Описанные в данном документе антитела к TIGIT маркируются следующим образом. Антитела имеют шифры, например, "CPA.9.086". Они отображают комбинацию переменных областей тяжелых и переменных областей легких цепей, как изображено на фиг. 53, например, с пониманием того, что эти антитела содержат две тяжелые цепи и две легкие цепи. "CPA.9.086.VH" относится к переменной части тяжелой цепи CPA. 9.086, тогда как "CPA. 9.086.VL" является переменной областью легкой цепи. "CPA. 9.086.vhCDR1", "CPA. 9.086.vhCDR2", "CPA. 9.086.vhCDR3", "CPA. 9.086.VLCDR1", "CPA. 9.086.VLCDR2" и "CPA. 9.086.VLCDR3", относится к CDR. "CPA. 9.086.HC" относится ко всей тяжелой цепи (например, переменной и константной домене) этой молекулы и "CPA.9.086.LC" относится ко всей легкой цепи (например, переменной и константной домене) той же молекулы. В общем, легкая

цепь каппа человека используется для константной области каждого фагового антитела (или гуманизированного гибридомного) в данном документе, хотя в некоторых вариантах осуществления используется константный домен легкой цепи лямбда. "CPA. 9.086.H1" относится к полноразмерному антителу, содержащему переменные домены тяжелой и легкой цепей, в том числе константного домена человеческого (Human) IgG1 (следовательно, H1; последовательности IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, изображены на фиг. 50). Соответственно "CPA. 9.086.H2" будет переменными доменами CPA. 9.086, связанными с человеческим (Human) IgG2. "CPA. 9.086.H3" будет переменными доменами CPA. 9.086, связанными с человеческим (Human) IgG3, и "CPA. 9.086.H4" будет переменными доменами CPA. 9.086, связанными с человеческим (Human) IgG4. Обратите внимание, что в некоторых случаях человеческие IgG могут иметь дополнительные мутации, которые описаны ниже, и это будет аннотировано. Например, во многих вариантах осуществления может быть мутация S241P в человеческом IgG4, и это, например, может быть аннотировано как "CPA.9.086.H4 (S241P)". Последовательность человеческого IgG4 с этим шарнирным вариантом S241P изображена на фиг. 50. Другими возможными вариантами являются IgG1 (N297A) (или другие варианты, которые лишены гликозилирования в этом сайте и, следовательно, многих эффекторных функций, связанных с связыванием FcγRIIIa) и IgG1 (D265A), что уменьшает связывание с рецепторами FcγR.

Изобретение также обеспечивает переменные домены тяжелых и легких цепей, а также полноразмерные тяжелые и легкие цепи.

В некоторых вариантах осуществления изобретение обеспечивает scFv, которые связываются с TIGIT, содержащим переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, связанный scFv-линкером, как описано выше. Домены VL и VH могут быть в любой ориентации, например, от N- до C-конца "VH-линкер-VL" или "VL-линкер-VH". Они называются по их составным частям; например, "scFv-CPA. 9.086.VH-линкер-VL" или "scFv-CPA.9.086.VL-линкер-VH". Таким образом, "scFv-CPA.9.086" может быть в любой ориентации.

Во многих вариантах осуществления антитела согласно изобретению являются человеческими (полученными из фага) и блокируют связывание TIGIT и PVR. Как изображено на фиг. 58 и 75, антитела CPA, которые как связывают, так и блокируют взаимодействие рецептор-лиганд, как указано ниже, с указанием их компонентов (как описано в разделе "Последовательность", последовательности всех, кроме конструкций scFv, имеются в перечне последовательностей):

CPA.9.018, CPA.9.018.VH, CPA.9.018.VL, CPA.9.018.HC, CPA.9.018.LC,
CPA.9.018.H1, CPA.9.018.H2, CPA.9.018.H3, CPA.9.018.H4; CPA.9.018.H4(S241P);
CPA.9.018.vhCDR1, CPA.9.018.vhCDR2, CPA.9.018.vhCDR3, CPA.9.018.vlCDR1,
CPA.9.018.vlCDR2, CPA.9.018.vlCDR3 и scFv-CPA.9.018;

CPA.9.027, CPA.9.027.VH, CPA.9.027.VL, CPA.9.027.HC, CPA.9.027.LC,
CPA.9.027.H1, CPA.9.027.H2, CPA.9.027.H3, CPA.9.027.H4; CPA.9.018.H4(S241P);
CPA.9.027.vhCDR1, CPA.9.027.vhCDR2, CPA.9.027.vhCDR3, CPA.9.027.vlCDR1,
CPA.9.027.vlCDR2, CPA.9.027.vlCDR3 and scFv-CPA.9.027;

CPA.9.049, CPA.9.049.VH, CPA.9.049.VL, CPA.9.049.HC, CPA.9.049.LC,
CPA.9.049.H1, CPA.9.049.H2, CPA.9.049.H3; CPA.9.049.H4; CPA.9.049.H4(S241P);
CPA.9.049.vhCDR1, CPA.9.049.vhCDR2, CPA.9.049.vhCDR3, CPA.9.049.vlCDR1,
CPA.9.049.vlCDR2, CPA.9.049.vlCDR3 и scFv-CPA.9.049;

CPA.9.057, CPA.9.057.VH, CPA.9.057.VL, CPA.9.057.HC, CPA.9.057.LC,
CPA.9.057.H1, CPA.9.057.H2, CPA.9.057.H3; CPA.9.057.H4; CPA.9.057.H4(S241P);

CPA.9.057.vhCDR1, CPA.9.057.vhCDR2, CPA.9.057.vhCDR3, CPA.9.057.vlCDR1, CPA.9.057.vlCDR2, CPA.9.057.vlCDR3 и scFv-CPA.9.057;

CPA.9.059, CPA.9.059.VH, CPA.9.059.VL, CPA.9.059.HC, CPA.9.059.LC, CPA.9.059.H1, CPA.9.059.H2, CPA.9.059.H3; CPA.9.059.H4; CPA.9.059.H4(S241P); CPA.9.059.vhCDR1, CPA.9.059.vhCDR2, CPA.9.059.vhCDR3, CPA.9.059.vlCDR1, CPA.9.059.vlCDR2, CPA.9.059.vlCDR3 и scFv-CPA.9.059;

CPA.9.083, CPA.9.083.VH, CPA.9.083.VL, CPA.9.083.HC, CPA.9.083.LC, CPA.9.083.H1, CPA.9.083.H2, CPA.9.083.H3; CPA.9.083.H4; CPA.9.083.H4(S241P); CPA.9.083.vhCDR1, CPA.9.083.vhCDR2, CPA.9.083.vhCDR3, CPA.9.083.vlCDR1, CPA.9.083.vlCDR2, CPA.9.083.vlCDR3 и scFv-CPA.9.083;

CPA.9.086, CPA.9.086.VH, CPA.9.086.VL, CPA.9.086.HC, CPA.9.086.LC, CPA.9.086.H1, CPA.9.086.H2, CPA.9.086.H3; CPA.9.086.H4; CPA.9.086.H4(S241P); CPA.9.086.vhCDR1, CPA.9.086.vhCDR2, CPA.9.086.vhCDR3, CPA.9.086.vlCDR1, CPA.9.086.vlCDR2, CPA.9.086.vlCDR3 и scFv-CPA.9.086;

CPA.9.089, CPA.9.089.VH, CPA.9.089.VL, CPA.9.089.HC, CPA.9.089.LC, CPA.9.089.H1, CPA.9.089.H2, CPA.9.089.H3; CPA.9.089.H4; CPA.9.089.H4(S241P); CPA.9.089.vhCDR1, CPA.9.089.vhCDR2, CPA.9.089.vhCDR3, CPA.9.089.vlCDR1, CPA.9.089.vlCDR2, CPA.9.089.vlCDR3 и scFv-CPA.9.089;

CPA.9.093, CPA.9.093.VH, CPA.9.093.VL, CPA.9.093.HC, CPA.9.093.LC, CPA.9.093.H1, CPA.9.093.H2, CPA.9.093.H3; CPA.9.093.H4; CPA.9.093.H4(S241P); CPA.9.093.vhCDR1, CPA.9.093.vhCDR2, CPA.9.093.vhCDR3, CPA.9.093.vlCDR1, CPA.9.093.vlCDR2, CPA.9.093.vlCDR3 и scFv-CPA.9.093;

CPA.9.101, CPA.9.101.VH, CPA.9.101.VL, CPA.9.101.HC, CPA.9.101.LC, CPA.9.101.H1, CPA.9.101.H2, CPA.9.101.H3; CPA.9.101.H4; CPA.9.101.H4(S241P); CPA.9.101.vhCDR1, CPA.9.101.vhCDR2, CPA.9.101.vhCDR3, CPA.9.101.vlCDR1, CPA.9.101.vlCDR2, CPA.9.101.vlCDR3 и scFv-CPA.9.101; и

CPA.9.103, CPA.9.103.VH, CPA.9.103.VL, CPA.9.103.HC, CPA.9.103.LC, CPA.9.103.H1, CPA.9.103.H2, CPA.9.103.H3; CPA.9.103.H4; CPA.9.103.H4(S241P); CPA.9.103.vhCDR1, CPA.9.103.vhCDR2, CPA.9.103.vhCDR3, CPA.9.103.vlCDR1, CPA.9.103.vlCDR2, CPA.9.103.vlCDR3 и scFv-CPA.9.103.

Кроме того, данное изобретение относится к ряду антител СНА, которые представляют собой мышиные антитела, полученные из гибридом. Как хорошо известно, шесть CDR полезны, когда они помещаются в любой каркасный участок варибельной области тяжелой цепи и варибельной области легкой цепи человека или когда варибельные домены тяжелой цепи и варибельные домены легкой цепи являются гуманизированными.

Соответственно данное изобретение относится к антителам, обычно полноразмерным или scFv-доменам, которые содержат следующие наборы CDR, последовательности которых изображены на фиг. 53 и/или в перечне последовательностей:

CHA.9.536.1, CHA.9.536.1.VH, CHA.9.536.1.VL, CHA.9.536.1.HC, CHA.9.536.1.LC,
 CHA.9.536.1.H1, CHA.9.536.1.H2, CHA.9.536.1.H3; CHA.9.536.1.H4,
 CHA.9.536.1.H4(S241P), CHA.9.536.1.vhCDR1, CHA.9.536.1.vhCDR2,
 CHA.9.536.1.vhCDR3, CHA.9.536.1.vlCDR1, CHA.9.536.1.vlCDR2 и CHA.9.536.1.vhCDR3;
 CHA.9.536.3, CHA.9.536.3.VH, CHA.9.536.3.VL, CHA.9.536.3.HC, CHA.9.536.3.LC,
 CHA.9.536.3.H1, CHA.9.536.3.H2, CHA.9.536.3.H3; CHA.9.536.3.H4,
 CHA.9.536.3.H4(S241P); CHA.9.536.3.vhCDR1, CHA.9.536.3.vhCDR2,
 CHA.9.536.3.vhCDR3, CHA.9.536.3.vlCDR1, CHA.9.536.3.vlCDR2 и CHA.9.536.3.vhCDR3;
 CHA.9.536.4, CHA.9.536.4.VH, CHA.9.536.4.VL, CHA.9.536.4.HC, CHA.9.536.4.LC,
 CHA.9.536.4.H1, CHA.9.536.4.H2, CHA.9.536.4.H3; CHA.9.536.4.H4,
 CHA.9.536.4.H4(S241P), CHA.9.536.4.vhCDR1, CHA.9.536.4.vhCDR2,
 CHA.9.536.4.vhCDR3, CHA.9.536.4.vlCDR1, CHA.9.536.4.vlCDR2 и CHA.9.536.4.vhCDR3;
 CHA.9.536.5, CHA.9.536.5.VH, CHA.9.536.5.VL, CHA.9.536.5.HC, CHA.9.536.5.LC,
 CHA.9.536.5.H1, CHA.9.536.5.H2, CHA.9.536.5.H3; CHA.9.536.5.H4,
 CHA.9.536.5.H4(S241P), CHA.9.536.5.vhCDR1, CHA.9.536.5.vhCDR2,
 CHA.9.536.5.vhCDR3, CHA.9.536.5.vlCDR1, CHA.9.536.5.vlCDR2 и CHA.9.536.5.vhCDR3;
 CHA.9.536.6, CHA.9.536.6.VH, CHA.9.536.6.VL, CHA.9.536.6.HC, CHA.9.536.6.LC,
 CHA.9.536.6.H1, CHA.9.536.6.H2, CHA.9.536.6.H3; CHA.9.536.6.H4, CHA.9.536.6.vhCDR1,
 CHA.9.536.6.vhCDR2, CHA.9.536.6.vhCDR3, CHA.9.536.6.vlCDR1, CHA.9.536.6.vlCDR2 и
 CHA.9.536.6.vhCDR3;
 CHA.9.536.7, CHA.9.536.7.VH, CHA.9.536.7.VL, CHA.9.536.7.HC, CHA.9.536.7.LC,
 CHA.9.536.7.H1, CHA.9.536.7.H2, CHA.9.536.7.H3; CHA.9.536.7.H4,
 CHA.9.536.7.H4(S241P); CHA.9.536.7.vhCDR1, CHA.9.536.7.vhCDR2,
 CHA.9.536.7.vhCDR3, CHA.9.536.7.vlCDR1, CHA.9.536.7.vlCDR2 и CHA.9.536.7.vhCDR3;
 CHA.9.536.8, CHA.9.536.8.VH, CHA.9.536.8.VL, CHA.9.536.8.HC, CHA.9.536.8.LC,
 CHA.9.536.8.H1, CHA.9.536.8.H2, CHA.9.536.8.H3; CHA.9.536.8.H4,
 CHA.9.536.8.H4(S241P), CHA.9.536.8.vhCDR1, CHA.9.536.8.vhCDR2,
 CHA.9.536.8.vhCDR3, CHA.9.536.8.vlCDR1, CHA.9.536.8.vlCDR2 и CHA.9.536.8.vhCDR3;
 CHA.9.560.1, CHA. 9.560.1.VH, CHA. 9.560.1.VL, CHA. 9.560.1.HC, CHA.
 9.560.1.LC, CHA. 9.560.1.H1, CHA. 9.560.1.H2, CHA. 9.560.1.H3; CHA. 9.560.1.H4, CHA.

9.560.1.H4(S241P), CHA. 9.560.1.vhCDR1, CHA. 9.560.1.vhCDR2, CHA. 9.560.1.vhCDR3, CHA. 9.560.1.vlCDR1, CHA. 9.560.1.vlCDR2 и CHA. 9.560.1.vhCDR3;

CHA.9.560.3, CHA. 9.560. 3VH, CHA. 9.560. 3.VL, CHA. 9.560. 3.HC, CHA. 9.560. 3.LC, CHA. 9.560. 3.H1, CHA. 9.560. 3.H2, CHA. 9.560. 3.H3; CHA.9.560.3.H4, CHA.9.560.3.H4(S241P); CHA. 9.560. 3.vhCDR1, CHA. 9.560. 3.vhCDR2, CHA. 9.560. 3.vhCDR3, CHA. 9.560. 3.vlCDR1, CHA. 9.560. 3.vlCDR2 и CHA. 9.560. 3.vhCDR3;

CHA.9.560.4, CHA. 9.560. 4VH, CHA. 9.560. 4.VL, CHA. 9.560. 4.HC, CHA. 9.560. 4.LC, CHA. 9.560. 4.H1, CHA. 9.560. 4.H2, CHA. 9.560. 4.H3; CHA.9.560.4.H4, CHA.9.560.4.H4 (S241P), CHA. 9.560. 4.vhCDR1, CHA. 9.560. 4.vhCDR2, CHA. 9.560. 4.vhCDR3, CHA. 9.560. 4.vlCDR1, CHA. 9.560. 4.vlCDR2 и CHA. 9.560. 4.vhCDR3;

CHA.9.560.5, CHA. 9.560. 5VH, CHA. 9.560. 5.VL, CHA. 9.560. 5.HC, CHA. 9.560. 5.LC, CHA. 9.560. 5.H1, CHA. 9.560. 5.H2, CHA. 9.560. 5.H3; CHA. 9.560. 5.H4, CHA. 9.560. 5.vhCDR1, CHA. 9.560. 5.vhCDR2, CHA. 9.560. 5.vhCDR3, CHA. 9.560. 5.vlCDR1, CHA. 9.560. 5.vlCDR2 и CHA. 9.560. 5.vhCDR3;

CHA.9.560.6, CHA. 9.560. 6VH, CHA. 9.560. 6.VL, CHA. 9.560. 6.HC, CHA. 9.560. 6.LC, CHA. 9.560. 6.H1, CHA. 9.560. 6.H2, CHA. 9.560. 6.H3; CHA.9.560.6.H4, CHA.9.560.6.H4 (S241P), CHA. 9.560. 6.vhCDR1, CHA. 9.560. 6.vhCDR2, CHA. 9.560. 6.vhCDR3, CHA. 9.560. 6.vlCDR1, CHA. 9.560. 6.vlCDR2 и CHA. 9.560. 6.vhCDR3;

CHA.9.560.7, CHA. 9.560. 7VH, CHA. 9.560. 7.VL, CHA. 9.560. 7.HC, CHA. 9.560. 7.LC, CHA. 9.560. 7.H1, CHA. 9.560. 7.H2, CHA. 9.560. 7.H3; CHA.9.560.7.H4; CHA.9.560.7.H4 (S241P); CHA. 9.560. 7.vhCDR1, CHA. 9.560. 7.vhCDR2, CHA. 9.560. 7.vhCDR3, CHA. 9.560. 7.vlCDR1, CHA. 9.560. 7.vlCDR2 и CHA. 9.560. 7.vhCDR3;

CHA.9.560.8, CHA. 9.560. 8VH, CHA. 9.560. 8.VL, CHA. 9.560. 8.HC, CHA. 9.560. 8.LC, CHA. 9.560. 8.H1, CHA. 9.560. 8.H2, CHA. 9.560. 8.H3; CHA.9.560.8.H4, CHA.9.560.8.H4 (S241P); CHA. 9.560. 8.vhCDR1, CHA. 9.560. 8.vhCDR2, CHA. 9.560. 8.vhCDR3, CHA. 9.560. 8.vlCDR1, CHA. 9.560. 8.vlCDR2 и CHA. 9.560. 8.vhCDR3;

CHA.9.546.1, CHA. 9. 546.1VH, CHA. 9. 546.1.VL, CHA. 9. 546.1.HC, CHA. 9. 546.1.LC, CHA. 9. 546.1.H1, CHA. 9. 546.1.H2, CHA. 9. 546.1.H3; CHA.9.546.1.H4, CHA.9.546.1.H4 (S241P), CHA. 9. 546.1.vhCDR1, CHA. 9. 546.1.vhCDR2, CHA. 9. 546.1.vhCDR3, CHA. 9. 546.1.vlCDR1, CHA. 9. 546.1.vlCDR2 и CHA. 9. 546.1.vhCDR3;

CHA.9.547.1, CHA. 9. 547.1VH, CHA. 9. 547.1.VL, CHA. 9. 547.1.HC, CHA. 9. 547.1.LC, CHA. 9. 547.1.H1, CHA. 9. 547.1.H2, CHA. 9. 547.1.H3; CHA.9.547.1.H4, CHA.9.547.1.H4 (S241P), CHA. 9. 547.1.vhCDR1, CHA. 9. 547.1.vhCDR2, CHA. 9. 547.1.vhCDR3, CHA. 9. 547.1.vlCDR1, CHA. 9. 547.1.vlCDR2 и CHA. 9. 547.1.vhCDR3;

CHA.9.547.2, CHA. 9. 547. 2VH, CHA. 9. 547. 2.VL, CHA. 9. 547. 2.HC, CHA. 9. 547.

2.LC, CHA. 9. 547. 2.H1, CHA. 9. 547. 2.H2, CHA. 9. 547. 2.H3; CHA.9.547.2.H4, CHA.9.547.2.H4 (S241P), CHA. 9. 547. 2.vhCDR1, CHA. 9. 547. 2.vhCDR2, CHA. 9. 547. 2.vhCDR3, CHA. 9. 547. 2.vlCDR1, CHA. 9. 547. 2.vlCDR2 и CHA. 9. 547. 2.vhCDR3;

CHA.9.547.3, CHA. 9. 547. 3VH, CHA. 9. 547. 3.VL, CHA. 9. 547. 3.HC, CHA. 9. 547. 3.LC, CHA. 9. 547. 3.H1, CHA. 9. 547. 3.H2, CHA. 9. 547. 3.H3; CHA.9.547.3.H4, CHA.9.547.3.H4 (S241P), CHA. 9. 547. 3.vhCDR1, CHA. 9.547. 3.vhCDR2, CHA. 9. 547. 3.vhCDR3, CHA. 9. 547. 3.vlCDR1, CHA. 9. 547. 3.vlCDR2 и CHA. 9. 547. 3.vhCDR3;

CHA.9.547.4, CHA. 9. 547. 4VH, CHA. 9. 547. 4.VL, CHA. 9. 547. 4.HC, CHA. 9.547. 4.LC, CHA. 9. 547. 4.H1, CHA. 9. 547. 4.H2, CHA. 9. 547. 4.H3; CHA.9.547.4.H4, CHA.9.547.4.H4 (S241P), CHA. 9. 547. 4.vhCDR1, CHA. 9. 547. 4.vhCDR2, CHA. 9. 547. 4.vhCDR3, CHA. 9. 547. 4.vlCDR1, CHA. 9. 547. 4.vlCDR2 и CHA. 9. 547. 4.vhCDR3;

CHA.9.547.6, CHA. 9. 547. 6 VH, CHA. 9. 547. 6.VL, CHA. 9. 547. 6.HC, CHA. 9. 547. 6.LC, CHA. 9. 547. 6.H1, CHA. 9. 547. 6.H2, CHA. 9. 547. 6.H3; CHA.9.547.6.H4, CHA.9.547.6.H4 (S241P), CHA. 9. 547. 6.vhCDR1, CHA. 9. 547. 6.vhCDR2, CHA. 9. 547. 6.vhCDR3, CHA. 9. 547. 6.vlCDR1, CHA. 9. 547. 6.vlCDR2 и CHA. 9. 547. 6.vhCDR3;

CHA.9.547.7, CHA. 9. 547. 7VH, CHA. 9. 547. 7.VL, CHA. 9. 547. 7.HC, CHA. 9. 547. 7.LC, CHA. 9. 547. 7.H1, CHA. 9. 547. 7.H2, CHA. 9. 547. 7.H3; CHA.9.547.7.H4, CHA.9.547.7.H4 (S241P), CHA. 9. 547. 7.vhCDR1, CHA. 9. 547. 7.vhCDR2, CHA. 9. 547. 7.vhCDR3, CHA. 9. 547. 7.vlCDR1, CHA. 9. 547. 7.vlCDR2 и CHA. 9. 547. 7.vhCDR3;

CHA.9.547.8, CHA. 9. 547. 8VH, CHA. 9. 547. 8.VL, CHA. 9. 547. 8.HC, CHA.9.547.8.LC, CHA. 9. 547. 8.H1, CHA. 9. 547. 8.H2, CHA. 9. 547. 8.H3; CHA.9.547.8.H4, CHA.9.547.8.H4 (S241P), CHA. 9. 547. 8.vhCDR1, CHA. 9. 547. 8.vhCDR2, CHA. 9. 547. 8.vhCDR3, CHA. 9. 547. 8.vlCDR1, CHA. 9. 547. 8.vlCDR2 и CHA. 9. 547. 8.vhCDR3;

CHA.9.547.9, CHA.9.547.9, CHA.9.547.9VH, CHA.9.547.9.VL, CHA.9. 547.9.HC, CHA.9.547.9.LC, CHA.9.547.9.H1, CHA.9.547.9.H2, CHA.9.547.9.H3; CHA.9.547.9.H4, CHA.9.547.9.H4, CHA.9.547.9.H4(S241P), CHA.9.547.9.H4(S241P), CHA.9.547.9.vhCDR1, CHA.9.547.9.vhCDR2, CHA.9.547.9.vhCDR3, CHA.9.547.9.vlCDR1, CHA.9.547.9.vlCDR2 и CHA.9.547.9.vhCDR3;

CHA.9.547.13, CHA.9.547.13, CHA.9.547. 13VH, CHA.9. 547.13.VL, CHA.9. 547.13.HC, CHA. 9.547.13.LC, CHA. 9.547.13.H1, CHA.9.547.13.H2, CHA.9. 547.13.H3; CHA.9.547.13.H4, CHA.9.547.13.H4, CHA.9.547.13.H4(S241P), CHA.9.547.13.H4(S241P), CHA. 9. 547.13.vhCDR1, CHA.9.547.13.vhCDR2, CHA.9.547. 13.vhCDR3, CHA. 9. 547.13.vlCDR1, CHA. 9. 547.13.vlCDR2 и CHA. 9. 547. 13.vhCDR3;

CHA.9.541.1, CHA. 9. 541.1.VH, CHA. 9. 541.1.VL, CHA. 9. 541.1.HC, CHA. 9. 541.1.LC, CHA. 9. 541.1.H1, CHA. 9. 541.1.H2, CHA. 9. 541.1.H3; CHA.9.541.1.H4,

CHA.9.541.1.H4(S241P), CHA. 9. 541.1.vhCDR1, CHA. 9. 541.1.vhCDR2, CHA. 9. 541.1.vhCDR3, CHA. 9. 541.1.vLCDR1, CHA. 9. 541.1.vLCDR2 и CHA. 9.541.1.vhCDR3;
 CHA.9.541.3, CHA. 9. 541. 3.VH, CHA. 9. 541. 3.VL, CHA. 9. 541. 3.HC, CHA. 9. 541. 3.LC, CHA. 9. 541. 3.H1, CHA. 9. 541. 3.H2, CHA. 9. 541. 3.H3; CHA.9.541.3.H4, CHA.9.541.3.H4 (S241P), CHA. 9. 541. 3.vhCDR1, CHA. 9. 541. 3.vhCDR2, CHA. 9. 541. 3.vhCDR3, CHA. 9. 541. 3.vLCDR1, CHA. 9. 541. 3.vLCDR2 и CHA. 9.541. 3.vhCDR3;
 CHA.9.541.4, CHA. 9. 541.4.VH, CHA. 9. 541. 4.VL, CHA. 9. 541. 4.HC, CHA. 9. 541. 4.LC, CHA. 9. 541. 4.H1, CHA. 9. 541. 4.H2, CHA. 9. 541. 4.H3; CHA.9.541.4.H4, CHA.9.541.4.H4 (S241P), CHA. 9. 541. 4.vhCDR1, CHA. 9. 541. 4.vhCDR2, CHA. 9. 541. 4.vhCDR3, CHA. 9. 541. 4.vLCDR1, CHA. 9. 541. 4.vLCDR2 и CHA. 9.541. 4.vhCDR3;
 CHA.9.541.5, CHA. 9. 541. 5.VH, CHA. 9. 541. 5.VL, CHA. 9. 541. 5.HC, CHA. 9. 541. 5.LC, CHA. 9. 541. 5.H1, CHA. 9. 541. 5.H2, CHA. 9. 541. 5.H3; CHA.9.541.5.H4, CHA.9.541.5.H4 (S241P), CHA. 9. 541. 5.vhCDR1, CHA. 9. 541. 5.vhCDR2, CHA. 9. 541. 5.vhCDR3, CHA. 9. 541. 5.vLCDR1, CHA. 9. 541. 5.vLCDR2 и CHA. 9.541. 5.vhCDR3;
 CHA.9.541.6, CHA. 9. 541. 6.VH, CHA. 9. 541. 6.VL, CHA. 9. 541. 6.HC, CHA. 9. 541. 6.LC, CHA. 9. 541. 6.H1, CHA. 9. 541. 6.H2, CHA. 9. 541.6.H3; CHA.9.541.6.H4, CHA.9.541.6.H4 (S241P), CHA. 9. 541. 6.vhCDR1, CHA. 9. 541. 6.vhCDR2, CHA. 9. 541. 6.vhCDR3, CHA. 9. 541. 6.vLCDR1, CHA. 9. 541. 6.vLCDR2 и CHA. 9.541. 6.vhCDR3;
 CHA.9.541.7, CHA. 9. 541. 7.VH, CHA. 9. 541. 7.VL, CHA. 9. 541. 7.HC, CHA. 9. 541. 7.LC, CHA. 9. 541. 7.H1, CHA. 9. 541. 7.H2, CHA. 9. 541. 7.H3; CHA.9.541.7.H4, CHA.9.541.7.H4 (S241P), CHA. 9. 541. 7.vhCDR1, CHA. 9. 541. 7.vhCDR2, CHA. 9. 541. 7.vhCDR3, CHA. 9. 541. 7.vLCDR1, CHA. 9. 541. 7.vLCDR2 и CHA. 9.541. 7.vhCDR3; и
 CHA.9.541.8, CHA. 9. 541. 8.VH, CHA. 9. 541. 8.VL, CHA. 9. 541. 8.HC, CHA. 9. 541. 8.LC, CHA. 9. 541. 8.H1, CHA. 9. 541. 8.H2, CHA. 9. 541. 8.H3; CHA.9.541.8.H4, CHA.9.541.8.H4 (S241P); CHA. 9. 541. 8.vhCDR1, CHA. 9. 541. 8.vhCDR2, CHA. 9. 541. 8.vhCDR3, CHA. 9. 541. 8.vLCDR1, CHA. 9. 541. 8.vLCDR2 и CHA. 9.541. 8.vhCDR3.

В случае scFv, содержащих CDR антител выше, они обозначены как scFv, которые включают scFv, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи с vhCDR, линкер и вариабельный домен легкой цепи с VLCDR, снова, как указано выше, в любой ориентации.

Таким образом изобретение включает

scFv-CHA.9.536.3.1, scFv-CHA.9.536.3, scFv-CHA.9.536.4, scFv-CHA.9.536.5, scFv-CHA.9.536.7, scFv-CHA.9.536.8, scFv-CHA.9.560.1, scFv-CHA.9.560.3, scFv-CHA.9.560.4, scFv-CHA.9.560.5, scFv-CHA.9.560.6, scFv-CHA.9.560.7, scFv-CHA.9.560.8, scFv-CHA.9.546.1, scFv-CHA.9.547.1, scFv-CHA.9.547.2, scFv-CHA.9.547.3, scFv-CHA.9.547.4, scFv-CHA.9.547.6, scFv-CHA.9.547.7, scFv-CHA.9.547.8, scFv-CHA.9.547.9, scFv-CHA.9.547.13, scFv-CHA.9.541.1, scFv-CHA.9.541.3, scFv-CHA.9.541.4, scFv-CHA.9.541.5, scFv-CHA.9.541.6, scFv-CHA.9.541.7 и scFv-CHA.9.541.8.

Кроме того, CHA.9.543 связывается с TIGIT, но не блокирует взаимодействие TIGIT-PVR.

Как обсуждалось в данном документе, изобретение дополнительно обеспечивает варианты вышеуказанных компонентов (CPA и CHA), включая варианты в CDR, как описано выше. Таким образом, изобретение обеспечивает антитела, содержащие набор из 6 CDR, как описано в данном документе, которые могут содержать одно, два или три различия аминокислот в наборе CDR, если антитело все еще связывается с TIGIT. Подходящие анализы для проверки того, является ли анти-TIGIT антитело, которое содержит мутации, по сравнению с последовательностями CDR, описанными в данном документе, известными в данной области техники, такие как анализы Biacore.

Кроме того, изобретение дополнительно обеспечивают варианты вышеперечисленных вариабельных областей тяжелых и легких цепей. В этом случае вариабельные области тяжелых цепей могут быть на 80, 90, 95, 98 или 99% идентичны последовательностям "VH" в данном документе и/или содержать от 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 аминокислотных изменений или более, когда используются Fc-варианты. Предложены вариабельные области легкой цепи, которые могут быть на 80, 90, 95, 98 или 99% идентичны последовательностям "VL" в данном документе (и, в частности, CPA.9.086) и/или содержать от 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 аминокислотных изменений или более, когда используются Fc-варианты. В этих вариантах осуществления изобретение включает эти варианты, если антитело все еще связывается с TIGIT. Подходящие анализы для проверки того, является ли анти-TIGIT антитело, которое содержит мутации, по сравнению с последовательностями CDR, описанными в данном документе, известными в данной области техники, такие как анализы Biacore.

Кроме того, предложены тяжелые и легкие цепи, которые на 80, 90, 95, 98 или 99% идентичны полноразмерным последовательностям "HC" и "LC" в данном документе (и, в частности, CPA.9.086) и/или содержат от 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 аминокислотных изменений или более, когда используются Fc-варианты. В этих вариантах осуществления изобретение включает эти варианты, если антитело все еще связывается с TIGIT. Подходящие анализы для проверки того, является ли анти-TIGIT антитело, которое содержит мутации, по сравнению с последовательностями CDR, описанными в данном документе, известными в данной области техники, такие как анализы Biacore.

Кроме того, каркасные области переменных областей тяжелых и переменных легких цепей или антител CPA или CHA в данном документе могут быть гуманизированы (или, в случае антител CHA, "регуманизированы", в той мере, в которой могут быть сделаны альтернативные методы гуманизации), как известно в данной области техники (со случайными вариантами, генерируемыми в CDR по мере необходимости), и, таким образом, могут быть созданы гуманизированные варианты VH- и VL-цепей на фиг. 53 (и, в частности, CPA.9.086). Кроме того, гуманизированные переменные домены тяжелые и легкие цепи могут затем сливаться с человеческими константными областями, такими как константные области от IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 (включая IgG4 (S241P)).

В частности, как известно в данной области техники, мышиные VH- и VL-цепи могут быть гуманизированы, как известно в данной области техники, например, используя программу IgBLAST на сайте NCBI, как описано в Ye et al. *Nucleic Acids Res.* 41: W34-W40 (2013), включенной в данный документ полностью посредством ссылки для методов гуманизации. IgBLAST принимает мышиную последовательность VH и/или VL и сравнивает ее с библиотекой известных последовательностей зародышевой линии человека. Как показано в данном документе, для гуманизированных последовательностей, генерируемых в данном документе, использованные базы данных были IMGT человеческих VH генов (F + OPC, 273 последовательности зародышевой линии) и IMGT человеческих VL-каппа генов (F + OPC, 74 последовательности зародышевой линии). Были выбраны иллюстративные пять последовательностей CHA: CHA.9.536, CHA.9.560, CHA.9.546, CHA.9.547 и CHA.9.541 (см. фиг. 53). Для этого варианта гуманизацииIGHV1-46 зародышевой линии человека (аллель 1) выбирали для всех 5 в качестве акцепторной последовательности и связывающей области тяжелой цепиIGHJ4 человека (аллель 1) (J-сегмент гена). Для трех из четырех (CHA.7.518, CHA.7.530, CHA.7.538_1 и CHA.7.538_2)IGKV1-39 (аллель 1) зародышевой линии человека был выбран в качестве акцепторной последовательности, иIGKJ2 (аллель 1) (J-сегмент гена) легкой цепи человека был выбран. J-сегмент гена был выбран из последовательностей областей слияния человека, собранных в IMGT® международной информационной системе ImMunoGeneTics как www.imgt.org. CDR определялись в соответствии с определением AbM (см. www.bioinfo.org.uk/abs/).

В некоторых вариантах осуществления анти-TIGIT антитела согласно данному изобретению включают анти-TIGIT антитела, в которых последовательности V_H и V_L различных анти-TIGIT антитела могут быть "смешаны и сопоставлены" для создания других анти-TIGIT антител. Связывание TIGIT таких "смешанных и сопоставленных" антител может быть протестировано с использованием анализов связывания, описанных выше, например, ИФА или анализы Biacore). В некоторых вариантах осуществления, когда V_H- и V_L-цепи смешивают и сопоставляют, последовательность V_H из конкретного спаривания V_H/V_L заменяется структурно подобной последовательностью V_H. Аналогичным образом, в некоторых вариантах осуществления последовательность V_L от конкретного спаривания V_H/V_L заменяется структурно подобной последовательностью V_L. Например, последовательности V_H и V_L гомологичных антител особенно поддаются смешиванию и сопоставлению.

Соответственно, антитела к TIGIT согласно изобретению содержат аминокислотные последовательности CDR, выбранные из группы, состоящей из (a) последовательностей, перечисленных в данном документе; (b) последовательности, которые отличаются от аминокислотных последовательностей CDR, указанных в (a), на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более аминокислотных замен; (c) аминокислотные последовательности, имеющие 90% или более, 95% или более, 98% или более, или 99% или более идентичность последовательности с последовательностями, указанными в (a) или (b); (d) полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая кодируется полинуклеотидом, имеющим последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислоты, перечисленные в данном документе. В частности, антитело CPA.9.086 может иметь последовательности, выбранные из (a), (b), (c) или (d).

Кроме того, в определение антител к TIGIT входят антитела, которые имеют идентичность с антителами к TIGIT, перечисленными в данном документе. То есть в некоторых вариантах осуществления анти-TIGIT антитело в соответствии с изобретением содержит переменные области тяжелой и легкой цепей, содержащие аминокислотные последовательности, которые идентичны всем или части аминокислотных последовательностей анти-TIGIT предпочтительных анти-TIGIT антител, соответственно, причем антитела сохраняют желаемые функциональные свойства исходных анти-TIGIT антител. Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией количества одинаковых положений, общих для данных последовательностей (т.е. % гомологии = # идентичных положений/общее количество положений × 100), с учетом количества гэпов и длины каждого гэпа, которые необходимо ввести для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и опреде-

ление процентной идентичности между двумя последовательностями может быть выполнено с использованием математического алгоритма, как описано в приведенных ниже неограничивающих примерах.

Процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями можно определить с использованием алгоритма E. Meyers и W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4: 11-17 (1988)), который был включен в программу ALIGN (версия 2.0), с использованием таблицы весов замен остатков PAM120, штраф за продления гэпа разрыв в размере 12 и штраф на введение гэпа в размере 4. Кроме того, процентная идентичность между двумя аминокислотными последовательностями может быть определена с использованием Needleman и Wunsch (J. Mol. Biol. 48: 444-453 (1970)), который был включен в программу GAP в программном пакете GCG (имеется в продаже), используя или матрицу Blossum 62, или матрицу PAM250, и штраф за открытие гэпа в размере 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и штраф за продолжение гэпа в размере 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Дополнительно или альтернативно белковые последовательности согласно данному изобретению могут дополнительно использоваться в качестве "запрашиваемой последовательности" для выполнения поиска по открытым базам данных, например, для идентификации связанных последовательностей. Такие поиски могут быть выполнены с использованием программы XBLAST (версия 2.0) Altschul, et al. (1990) J Mol. Biol. 215:403-10. Поиск белков в BLAST может выполняться с помощью программы XBLAST, оценка = 50, длина слова = 3, чтобы получить аминокислотные последовательности, гомологичные молекулам антитела, в соответствии с по меньшей мере некоторыми вариантами осуществления изобретения. Для получения выравниваний с гэпами для целей сравнения может быть использован Gapped BLAST как описано в Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST могут использоваться параметры по умолчанию для соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST).

В общем, процентная идентичность для сравнения между антителами к TIGIT составляет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, причем предпочтительнее по меньшей мере 95, 96, 97, 98 или 99%. Процентная идентичность может быть вдоль всей аминокислотной последовательности, например, по всей тяжелой или легкой цепи, или вдоль части цепей. Например, в определение анти-TIGIT антител согласно изобретению относятся те, которые разделяют идентичность вдоль всей вариабельной области (например, где идентичность равна 95 или 98% вдоль вариабельных областей) или вдоль всей константной области или вдоль только Fc-домена. В частности, изобретение обеспечивает антитела к TIGIT, которые имеют по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, с предпочтительной по меньшей мере приблизительно 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью с антителом CPA.9.086.

Кроме того, также включены последовательности, которые могут иметь идентичные CDR, но изменения в каркасных частях вариабельного домена (или всей тяжелой или легкой цепи). Например, антитела к TIGIT включают антитела с CDR, идентичные изображенному на фиг. 53, но идентичность которых вдоль вариабельной области может быть ниже, например, 95 или 98% идентичности. В частности, изобретение обеспечивает антитела к TIGIT, которые имеют идентичные CDR к CPA.9.086, но с каркасными областями, которые на 95 или 98% идентичны CPA.9.086.

A. Антитела к TIGIT, которые конкурируют за связывание

В данном изобретении предложены не только перечисленные антитела, но и дополнительные антитела, которые конкурируют с перечисленными антителами (номера CPA, перечисленные в данном документе, которые специфически связываются с TIGIT), для специфического связывания с молекулой TIGIT. Как показано в примере 16, антитела к TIGIT согласно изобретению "сортируются" в различные эпитопные группы. Среди 44 антител к TIGIT в исследовании эпитоп-специфической сортировки имеются четыре сообщества, каждое из которых имеет связанные парные блокирующие паттерны, которые разделены на 12 общих дискретных групп, описанных в данном документе и изображенных на фиг. 67 и 68. В данном документе представлено двенадцать дискретных групп;

- 1) BM9-H4, CHA.9.525, CPA.9.081-H4, CHA.9.538, CHA.9.553, CPA.9.069-H4, CHA.9.543, CHA.9.556, CPA.9.077-H4 и CHA.9.561; 2) CHA.9.560 и CHA.9.528; 3) CHA.9.552, CHA.9.521, CHA.9.541, CHA.9.529, CHA.9.519, CHA.9.527 and CHA.9.549; 4) CPA.9.057-H4 и CHA.9.554; 5) CHA.9.546, CPA.9.012-H4, CHA.9.547, CPA.9.013-H4, CPA.9.018-H4, MBSA43-M1, Sino PVR-Fc (лиганд), CHA.9.555, PVR-Fc M2A (лиганд), BM29-H4, CPA.9.027-H4, CPA.9.049-H4 и CPA.9.053-H4; 6) CPA.9.064-H4; 7) BM26-H4; 8) CPA.9.059-H4; 9) CHA.9.535 и CPA.9.009-H4; 10) CHA.9.536, CHA.9.522 и CPA.9.015-H4; 11) CPA.9.011-H4 и BM8-H4 и 12) CPA.9.071-H4.

Таким образом, изобретение обеспечивает анти-TIGIT антитела, которые конкурируют за связывание с антителами, которые находятся в дискретных эпитопных группах с 1 по 12. В конкретном варианте осуществления изобретение обеспечивает анти-TIGIT антитела, которые конкурируют за связывание с CPA.9.086 и по меньшей мере на 95, 96, 97, 98 или 99% идентичны CPA.9.086.

Дополнительные антитела, которые конкурируют с перечисленными антителами, созданы, как известно в данной области техники, и в целом описаны ниже. Исследования конкурентного связывания

могут быть проведены, как известно в данной области техники, обычно с использованием анализов связывания ППП/Biascore®, а также с использованием ИФА и клеточных анализов.

VIII. Антитела к PVRIG

В данном изобретении предложены анти-PVRIG антитела (для удобства "анти-PVRIG антитела" и "антитела к PVRIG" используются взаимозаменяемо). Анти-PVRIG антитела согласно изобретению специфически связываются с человеческим PVRIG и предпочтительно с ВКД человеческого PVRIG.

Специфическое связывание PVRIG или эпитопа PVRIG может быть проявлено, например, антителом, имеющим K_D по меньшей мере около 10^{-4} М, по меньшей мере около 10^{-5} М, по меньшей мере около 10^{-6} М, по меньшей мере около 10^{-7} М, по меньшей мере около 10^{-8} М, по меньшей мере около 10^{-9} М, по меньшей мере около 10^{-10} М, по меньшей мере около 10^{-11} М, по меньшей мере около 10^{-12} М или более, где K_D относится к скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Как правило, антитело, которое специфически связывает антиген, будет иметь K_D , которое в 20, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000 или более раз для контрольной молекулы относительно антигена или эпитопа PVRIG.

Однако, как показано в примерах WO2016/134333, для оптимального связывания с PVRIG, экспрессируемого на поверхности NK- и Т-клеток, антитела предпочтительно имеют K_D менее 50 нМ и наиболее предпочтительно менее чем 1 нМ, при использовании менее чем 0,1 нМ и менее чем 1 и 0,1 пМ в способах изобретения.

Также может проявляться специфическое связывание конкретного антигена или эпитопа, например, антителом, имеющем K_A или K_a для антигена или эпитопа PVRIG по меньшей мере в 20, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000 или еще больше раз для эпитопа относительно контроля, где K_A или K_a относится к скорости ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.

В некоторых вариантах осуществления анти-PVRIG антитела согласно изобретению связываются с человеческим PVRIG с K_D 100 нМ или менее, 50 нМ или менее, 10 нМ или менее, или 1 нМ или менее (то есть с более высокой аффинностью связывания), или 1 пМ или менее, причем K_D определяется известными способами, например поверхностным плазмонным резонансом (ППР, например, анализы Biascore), ИФА (твердофазный иммуноферментный анализ), KINEXA (анализ кинетического исключения) и самый обычный ППП при 25 или 37°C.

Важно отметить, что аффинность связывания для анти-PVRIG антитела неожиданно коррелирует с активностью. Кумулятивный анализ данных скрининга демонстрируют, что аффинность анти-PVRIG антител согласно изобретению в значительной степени коррелирует с их способностью связываться с первичными Т-клетками человека. Более конкретно, антитела, которые дали наивысший максимальный сигнал на Т-клетках, были антителами с аффинностью в пикомолярном диапазоне. Антитела, которые имели аффинность в низком наномолекулярном диапазоне и выше, давали относительно слабые максимальные сигналы на Т-клетках. Таким образом, данные демонстрируют, что полезность анти-PVRIG антител для иммунотерапии на основе Т-клеток может быть определена, частично, на основе их аффинности. Ссылка делается на последовательности антител из WO 2016/134333, включенную в данный документ посредством ссылки и, в частности, для антигенсвязывающих доменов анти-PVRIG, приведенных на фиг. 38 (на которой изображены последовательности, которые связывают PVRIG и блокируют взаимодействие PVRIG и PVRL2), фиг. 39 (на которой изображены последовательности, которые связывают PVRIG и не блокируют взаимодействие PVRIG и PVRL2), фиг. 40 (на которой изображены CDR и данные от этих антител) и фиг. 41 на которой изображены CDR из гибридом, которые связывают и блокируют). То есть, фигуры и условные обозначения, а также конкретные последовательности и SEQ ID NO: от всех антител CPA.7 и CHA.7 (включая CDR, VH и VL и полноразмерные последовательности) из WO 02016/134333 явно включены в данный документ.

На чертеже проиллюстрирована способность двух анти-PVRIG антител с разной аффинностью связывать первичные CD8 Т-клетки. Как изображено на фигуре, CHA.7.518 имеет примерно в 8 раз более высокую аффинность, чем CPA.7.021 (последовательность в WO 2016/13433) как измерено посредством связывания с клетками HEK, модифицированными для сверхэкспрессии PVRIG (HEK hPVRIG). В соответствии с этим CHA.7.518 имеет приблизительно 13-кратное более высокую аффинность, чем CPA.7.021, как измерено путем связывания с клетками Jurkat. Более высокая аффинность CHA.7.518 соответствовала большему максимальному сигналу связывания от клеток HEK hPVRIG, но не от клеток Jurkat.

Напротив, CHA.7.518 последовательно давал более высокий максимальный сигнал связывания с первичными CD8 Т-клетками по сравнению с CPA.7.021. Это проиллюстрировано в эксперименте по связыванию титрования, в котором различные концентрации изотипа или анти-PVRIG антитела были добавлены к первичным CD8 Т-клеткам, и измеряли полученный максимальный сигнал связывания. В двух изображенных донорах CHA.7.518 последовательно выдавал более высокий максимальный сигнал (геометрическая средняя интенсивность флуоресценции, гСИФ), чем CPA.7.021, в зависимости от титрования. $gMFI_g$ = геометрическая средняя интенсивность флуоресценции антитела, представляющего интерес/геометрическая интенсивность флуоресценции контрольного антитела. Указанная $gMFI_g$ измеряет сигнал представляющего интерес антитела относительно изотипического антитела при фиксированной

концентрации обоих.

Соответственно анти-PVRIG антитела согласно изобретению имеют аффинность связывания (как измерено с использованием способов, описанных в данном документе) в пиколярном диапазоне, например, от 0,1 до 9 пМ, причем предпочтительным является от около 0,2 до около 2 и от около 0,2 до около 0,5 для практического использования.

Что касается антител к TIGIT, антитела к PVRIG аналогично маркируются следующим образом. Антитела имеют кодовые номера, например "CHA.7.518.1". Это представляет собой комбинацию переменных областей тяжелых и легких цепей, как изображено на фиг. , например, с пониманием того, что эти антитела содержат две тяжелые цепи и две легкие цепи. "CPA. 7.518.1.VH" относится к переменной части тяжелой цепи CPA.7.518.1, тогда как "CPA.7.518.1.VL" представляет собой переменную часть легкой цепи. "CPA.7.518.1.vhCDR1", "CPA.7.518.1.vhCDR2", "CPA.7.518.1.vhCDR3", "CPA.7.518.1.vicDR1", "CPA. 7.518.1.vLCDR2", и "CPA. 7.518.1.vLCDR3", относятся к CDR, которые указаны "CPA. 7.518.1.HC" относится ко всей тяжелой цепи (например, переменной и константной домене) этой молекулы и "CPA. 7.518.1.LC" относится ко всей легкой цепи (например, переменной и константной домене) той же молекулы. В общем, легкая цепь каппа человека используется для константного домена каждого фагового антитела (или гуманизированного гибридного) в данном документе, хотя в некоторых вариантах осуществления используется константный домен легкой цепи лямбда. "CPA. 7.518.1.H1" относится к полноразмерному антителу, содержащему переменные домены тяжелой и легкой цепей, в том числе константного домена человеческого (Human) IgG1 (следовательно, H1; последовательности IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, изображены на чертеже). Соответственно, "CPA. 7.518.1.H2" будет переменными доменами CPA. 7.518.1, связанными с человеческим (Human) IgG2. "CPA. 7.518.1.H3" будет переменными доменами CPA. 7.518.1, связанными с человеческим (Human) IgG3, и "CPA. 7.518.1.H4" будет переменными доменами CPA. 7.518.1, связанными с человеческим (Human) IgG4. Обратите внимание, что в некоторых случаях человеческие IgG могут иметь дополнительные мутации, которые описаны ниже, и это будет аннотировано. Например, во многих вариантах осуществления может быть мутация S241P в человеческом IgG4 и это может быть помечено как "CPA.7.518.1.H4(S241P)", например. Последовательность IgG4 человека с этим шарнирным вариантом S241P изображена на фигуре. Другими возможными вариантами являются IgG1 (N297A) (или другие варианты, которые лишены гликозилирования на этом сайте и, следовательно, многие эффекторные функции, связанные со связыванием FcγRIIIa) и IgG1 (D265A), что уменьшает связывание с рецепторами FcγR.

Изобретение дополнительно обеспечивает переменные домены тяжелых и легких цепей, а также полноразмерные тяжелые и легкие цепи.

В некоторых вариантах осуществления изобретение обеспечивает scFv, которые связываются с PVRIG, содержащим переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, связанный scFv-линкером, как описано выше. Домены VL и VH могут быть в любой ориентации, например, от N- до C-конца "VH-линкер-VL" или "VL-линкер-VH". Они называются по их составным частям; например, "scFv-CHA.7.518.1VH-линкер-VL" или "scFv-CPA. 7.518.1.VL-линкер-VH." Таким образом, "scFv-CPA. 7.518.1" может быть в любой ориентации.

IX. Нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела

Также представлены композиции нуклеиновой кислоты, кодирующие антитела согласно изобретению, а также векторы экспрессии, содержащие нуклеиновые кислоты и клетки-хозяева, трансформированные с использованием композиций нуклеиновых кислот и/или векторов экспрессии. Как будет понятно специалистам в данной области техники, последовательности белка, описанные в данном документе, могут быть закодированы любым количеством возможных последовательностей нуклеиновой кислоты из-за вырождения генетического кода.

Композиции нуклеиновых кислот, которые кодируют антитела, будут зависеть от формата антитела. Для стандартных тетрамерных антител, содержащих две тяжелые цепи и две легкие цепи, которые кодируются двумя разными нуклеиновыми кислотами, одна из которых кодирует тяжелую цепь, и другая кодирует легкую цепь. Они могут быть помещены в один вектор экспрессии или два вектора экспрессии, как известно в данной области техники, трансформированы в клетки-хозяева, где они экспрессируются с образованием антител согласно изобретению. В некоторых вариантах осуществления, например, когда используются конструкции scFv, обычно используют одну нуклеиновую кислоту, кодирующую переменную область тяжелой цепи-линкер-легкую цепь, которая может быть вставлена в вектор экспрессии для трансформации в клетки-хозяева. Нуклеиновые кислоты можно вводить в векторы экспрессии, которые содержат соответствующие последовательности контроля транскрипции и трансляции, включая, но не ограничиваясь ими, сигнальные и секреторные последовательности, регуляторные последовательности, промоторы, точки начала репликации, селективные гены и т. д.

Предпочтительные клетки-хозяева млекопитающих для экспрессии рекомбинантных антител в соответствии с по меньшей мере некоторыми вариантами осуществления изобретения включают клетки яичника китайского хомячка (клетки CHO), PER.C6, HEK293 и другие, как известно в данной области техники.

Нуклеиновые кислоты могут присутствовать в целых клетках, в клеточном лизате или в частично

очищенной или по существу чистой форме. Нуклеиновая кислота "выделяется" или "приведена в практически чистую форму" при очистке от других клеточных компонентов или других загрязнителей, например, других клеточных нуклеиновых кислот или белков, стандартными методами, включая обработку щелочью/ДСН, разделение в CsCl, колоночную хроматографию, электрофорез в агарозном геле и другие, хорошо известные в данной области техники.

Для создания гена scFv фрагменты ДНК, которые кодируют V_H и V_L функционально связаны с другим фрагментом, кодирующим гибкий линкер, например, кодирующим аминокислотную последовательность (Gly4-Ser) 3 и другими, обсуждаемыми в данном документе, так что последовательности V_H и V_L могут быть экспрессированы как непрерывный одноцепочечный белок, причем области V_L и V_H соединены гибким линкером.

Х. Композиции

Терапевтические композиции, используемые в практике вышеприведенных способов (и, в частности, США.7.518.1.H4 (S241P) и СРА.9.086), могут быть составлены в фармацевтические композиции, содержащие носитель, подходящий для желаемого способа доставки. Подходящие носители включают любой материал, который в комбинации с терапевтической композицией сохраняет противоопухолевую функцию терапевтической композиции и, как правило, не реагирует с иммунной системой пациента. Примеры включают, но не ограничиваются ими, любой из ряда стандартных фармацевтических носителей, таких как стерильные натрий-фосфатные буферные растворы, бактериостатическая вода и тому подобное (см., как правило, Remington's Pharmaceutical Sciences ^{16th} Edition, A. Osal, Ed., 1980). Приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов при используемых дозах и концентрациях и могут включать буферы.

В предпочтительном варианте осуществления фармацевтическая композиция, которая содержит антитела согласно изобретению, может быть в водорастворимой форме, такой, как присутствующая в виде фармацевтически приемлемых солей, которая, как предполагается, включает соль присоединения кислоты и основания. "Фармацевтически приемлемая соль присоединения кислоты" относится к тем солям, которые сохраняют биологическую эффективность свободных оснований и которые не являются биологически или иным образом нежелательными, с помощью неорганических кислот и т.п. "Фармацевтически приемлемые соли присоединения оснований" включают соединения, полученные из неорганических оснований и тому подобное.

Введение фармацевтической композиции, содержащей антитела согласно данному изобретению, предпочтительно в виде стерильного водного раствора, может осуществляться различными способами, включая, но не ограничиваясь ими, подкожно и внутривенно.

Количества дозы и частоты введения в предпочтительном варианте осуществления выбраны для терапевтической или профилактической эффективности. Как известно в данной области техники, корректировки на деградацию белка, системную и локальную доставку и скорость синтеза новой протеазы, а также возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол, диету, время введения, взаимодействие с лекарственным средством и тяжесть патологического состояния может быть необходимым и будет определено с помощью стандартных экспериментов специалистами в данной области техники.

Для лечения пациента можно вводить терапевтически эффективную дозу Fc-варианта согласно данному изобретению. Под "терапевтически эффективной дозой" в данном документе понимается доза, которая дает эффекты, для которых она вводится. Точная доза будет зависеть от цели лечения и будет определена специалистом в данной области техники с использованием известных методик.

XI. Способы использования антител

Антитела согласно изобретению, включая как антитела к PVRIG, так и к TIGIT, могут использоваться в ряде диагностических и терапевтических применений. В некоторых случаях решение о том, какое антитело вводить пациенту, проводят с использованием оценки уровней экспрессии (уровни экспрессии генов или уровни экспрессии белка, причем последний является предпочтительным) биопсий образцов опухолей, чтобы определить, сверхэкспрессирует ли образец или TIGIT, или PVRIG, или и то, и другое, чтобы определить, какие терапевтические антитела вводить.

А. Диагностическое применение

Соответственно антитела согласно изобретению также находят применение в диагностике *in vitro* или *in vivo*, включая визуализацию опухолей, которые сверхэкспрессируют или PVRIG, или TIGIT, соответственно. Следует, однако, отметить, что, как обсуждалось в данном документе, как TIGIT, так и PVRIG, в качестве иммуноонкологических целевых белков, не обязательно сверхэкспрессируются на раковых клетках, а скорее в иммунных инфильтратах при раке. Таким образом, механизм действия, например, активация иммунных клеток, таких как Т-клетки и НК-клетки, обуславливают диагностику рака. Соответственно, эти антитела могут использоваться для диагностики рака. Диагностика с использованием антител к PVRIG также описана в WO 2016/134333, [0434-0459], включенном в данный документ посредством ссылки.

Как правило, диагностика может быть выполнена несколькими способами. В одном варианте осуществления ткань от пациента, такого как образец биопсии, контактирует с, как правило, меченым, антителом к TIGIT, таким образом, что антитело связывается с эндогенным TIGIT. Уровень сигнала срав-

нивают с уровнем нормальной нераковой ткани или у одного и того же пациента, или с эталонным образцом, чтобы определить наличие или отсутствие рака. Образец биопсии может быть получен из солидной опухоли, образца крови (для лимфом и лейкозов, таких как ОЛЛ (острый лимфобластный лейкоз), Т-клеточная лимфома и т.д.).

В общем, в этом варианте осуществления анти-TIGIT метят, например, флуорофором или другой оптической меткой, которая детектируется с использованием флуориметра или другой оптической системы обнаружения, как хорошо известно в данной области техники. В альтернативном варианте осуществления вторичное меченое антитело приводят в контакт с образцом, например, с использованием антитела против человеческого IgG от другого млекопитающего (мыши, крысы, кролика, козы и т.д.), для выполнения сэндвич-анализа, как известно в данной области техники. Альтернативно, анти-TIGIT мкАт может быть непосредственно мечено (то есть биотином), и обнаружение может быть выполнено вторичным Ат, направленным на меченый агент в данной области техники.

После того, как определяют сверхэкспрессию TIGIT, лечение может продолжаться при введении анти-TIGIT антитела в соответствии с изобретением, как описано в данном документе.

В других вариантах осуществления проводится диагностика *in vivo*. Как правило, в этом варианте осуществления анти-TIGIT антитело (включая фрагменты антитела) вводится пациенту и выполняется визуализация. В этом варианте осуществления, например, антитело обычно помечено оптической меткой или меткой для МРТ, такой как хелат гадолиния, радиоактивное мечение мкАт (включая фрагменты).

В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в данном документе, используются как для диагностики, так и для лечения, или только для диагностики. Когда анти-TIGIT антитела используются как для диагностики, так и для лечения, некоторые варианты осуществления основываются на двух разных анти-TIGIT антителах к двум различным эпитопам, так что диагностическое антитело не конкурирует за связывание с терапевтическим антителом, хотя в некоторых случаях одно и то же антитело может использоваться для обоих случаев. Например, это можно сделать с использованием антител, которые находятся в разных группах, например, которые связываются с различными эпитопами на TIGIT, например, так как описано в данном документе. Таким образом, в изобретение включены композиции, содержащие диагностическое антитело и терапевтическое антитело, а в некоторых вариантах диагностическое антитело метят, как описано в данном документе. Кроме того, композицию терапевтических и диагностических антител можно также вводить совместно с другими лекарственными средствами, как описано в данном документе.

Особенно полезные антитела для применения в диагностике, включают, но не ограничиваются этими перечисленными антителами, или антителами, которые используют CDR с вариантными последовательностями, или те, которые конкурируют за связывание с любым из антител с чертежа.

Во многих вариантах осуществления диагностическое антитело метят. Под "меченым" в данном документе подразумевается, что раскрытые в данном документе антитела содержат один или более элементов, изотопов или химических соединений, присоединенных для обеспечения детекции в анализе или в диагностической процедуре. В общем, метки делятся на несколько классов: а) иммунные метки, которые могут быть эпитопом, включенным в качестве партнера по слиянию, который распознается антителом; б) изотопные метки, которые могут быть радиоактивными или тяжелыми изотопами; в) низкомолекулярные метки, которые могут включать флуоресцентные и колориметрические красители или молекулы, такие как биотин, которые позволяют использовать другие методы мечения, и d) метки, такие как частицы (включая пузырьки для мечения ультразвуком) или парамагнитные метки, которые обеспечивают визуализацию в теле. Эти метки могут быть включены в антитела в любом положении и могут быть введены *in vitro* или *in vivo* во время экспрессии белка, как известно в данной области техники.

Диагноз может быть поставлен или *in vivo*, или путем введения диагностического антитела, которое позволяет получать визуализацию всего тела, как описано ниже, или *in vitro*, на образцах, удаленных из пациента. "Образец" в этом контексте включает любое количество вещей, включая, но не ограничиваясь ими, физические жидкости (включая, но не ограничиваясь ими, кровь, мочу, сыворотку, лимфу, слюну, анальную и вагинальную секрецию, пот и сперму), а также образцы тканей, такие как результат биопсии соответствующих тканей.

Кроме того, как показано ниже и в примерах и фигурах, информацию об уровнях экспрессии белка как PVRIG, так и TIGIT, или обоих, или PVRIG и PD-1, или TIGIT и PD-1, могут быть использованы для определения того, какие антитела следует вводить пациенту.

В. Лечение рака

Антитела согласно изобретению особенно полезны при лечении рака. В общем, антитела согласно изобретению являются иммуномодулирующими, в то, что вместо непосредственной атаки раковых клеток, антитела согласно изобретению стимулируют иммунную систему, как правило, путем ингибирования действия рецептора контрольной точки (например, PVRIG или TIGIT). Таким образом, в отличие от опухолеспецифических терапий, которые направлены на ингибирование молекулярных путей, которые имеют критическое значение для роста и развития опухоли и/или истощения опухолевых клеток, иммунотерапия рака направлена на стимуляцию собственной иммунной системы пациента для устранения раковых клеток, обеспечивая разрушение стойкой опухоли. В терапии рака могут использоваться раз-

личные подходы, в том числе терапевтические противораковые вакцины для индуцирования опухоеспецифических Т-клеточных ответов и иммуностимулирующие антитела (т.е. антагонисты ингибиторных рецепторов = иммунные контрольные точки) для удаления иммуносупрессивных путей.

Клинические ответы с таргетной терапией или традиционной противораковой терапией, как правило, являются временными, поскольку раковые клетки развивают устойчивость, и происходит рецидив опухоли. Тем не менее, клиническое использование противораковой иммунотерапии в последние несколько лет показало, что этот тип терапии может иметь длительные клинические ответы, демонстрируя сильное воздействие на долгосрочную выживаемость. Однако, хотя ответы являются долгосрочными, только небольшое число пациентов отвечает (в отличие от традиционной или таргетной терапии, когда отвечает большое число пациентов, но ответы являются временными).

К тому времени, когда опухоль обнаруживается клинически, она уже уклонилась от системы иммунной защиты, путем приобретения иммунорезистентных и иммунодепрессивных свойств и создания иммуносупрессивного микроокружения опухоли посредством различных механизмов и различных иммунных клеток.

Соответственно, антитела согласно изобретению полезны для лечения рака. Из-за природы иммуноонкологического механизма действия рецептор контрольной точки (TIGIT или PVRIG) необязательно должен быть сверхэкспрессирован или коррелирован с конкретным типом рака; то есть цель состоит в том, чтобы антитела снимали подавление активации Т-клеток и NK-клеток, так что иммунная система реагировала на онкологические заболевания.

"Рак", используемый в данном документе, относится в целом к любому неопластическому заболеванию (инвазивному или метастатическому), характеризующемуся аномальным и неконтролируемым делением клеток, вызывающим злокачественный рост или опухоль (например, нерегулируемый рост клеток). Термин "рак" или "злокачественный", используемый в данном документе, следует понимать как охватывающий любое неопластическое заболевание (инвазивное, неинвазивное или метастатическое), которое характеризуется аномальным и неконтролируемым делением клеток, вызывающим злокачественный рост или опухоль, неограничивающие примеры которых описаны в данном документе. Это включает любое физиологическое состояние у млекопитающих, которое обычно характеризуется нерегулируемым ростом клеток. Примеры рака приведены в рабочих примерах, а также описаны в описании.

Неограничивающие примеры рака, которые можно лечить с использованием антител согласно изобретению, включают, но не ограничиваются ими, карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкоз. Более конкретные примеры таких онкологических заболеваний включают плоскоклеточный рак, рак легких (в том числе мелкоклеточный рак легких, немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого и плоскоклеточный рак легких), рак брюшной полости, гепатоцеллюлярный рак желудка или рак желудка (в том числе рак желудочно-кишечного тракта), рак поджелудочной железы, глиобластому, рак шейки матки, рак яичников, меланому, немеланомный рак кожи (плоскоклеточную и базальноклеточную карциному), рак печени, рак мочевого пузыря, гепатому, рак молочной железы, рак толстой кишки, колоректальный рак, рак эндометрия или матки, карциному слюнной железы, рак почки или ренальный, рак печени, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, карциному печени и различные типы рака головы и шеи, а также В-клеточную лимфому (в том числе медленно растущая/фолликулярная неходжкинская лимфома (НХЛ); мелкоклеточная лимфоцитарная (МЛ) НХЛ, среднеагрессивная/фолликулярная НХЛ, среднеагрессивная диффузная НХЛ, быстро растущая иммунобластная НХЛ, быстро растущая лимфобластная НХЛ, быстро растущая мелкоклеточная НХЛ, генерализованная НХЛ; мантийноклеточная лимфома; СПИД-ассоциированная лимфома; и макроглобулинемия Вальденстрема); хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ); острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ); волосатоклеточный лейкоз; хронический миелобластный лейкоз; множественную миелому и посттрансплантационное лимфопролиферативное расстройство (ПТЛД).

Как показано в примерах WO 2016/134333, PVRIG сверхэкспрессируется и/или коррелирует с инфильтрацией опухолевых лимфоцитов (что подтверждается корреляцией с экспрессией CD3, CD4, CD8 и PD-1) в ряде различных опухолей различного происхождения и таким образом, полезен при лечении любого рака, включая, но не ограничиваясь ими, рак предстательной железы, рак печени (НСС), колоректальный рак, рак яичников, рак эндометрия, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак шейки матки, рак головы и шеи, рак щитовидной железы, рак яичка, рак уротелия, рак легкого, меланому, немеланомный рак кожи (плоскоклеточную и базальноклеточную карциному), глиому, рак почки (RCC), лимфому (неходжкинская лимфома (НХЛ) и лимфома Ходжкина (НД)), острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), Т-клеточный острый лимфобластный лейкоз (Т-ALL), диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, опухоли половых клеток яичка, мезотелиому и рак пищевода.

В частности, США 7.518.Ш4 (S241P) находит применение при лечении рака предстательной железы, рака печени (НСС), колоректального рака, рака яичников, рака эндометрия, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака желудка, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака щитовидной железы, рака яичка, рака уротелия, рака легкого, меланомы, немеланомного рака кожи (плоскоклеточной и базальноклеточной карциномы), глиомы, рак почки (RCC), лимфомы (НХЛ или ХЛ), острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза (Т-ALL), диффузной крупноклеточной В-

клеточной лимфомы, опухоли половых клеток яичка, мезотелиомы, рака мочевого пузыря и рака пищевода.

В частности, СНА.7.538.1.2.H4(S241P) находит применение при лечении рака предстательной железы, рака печени (HCC), колоректального рака, рака яичников, рака эндометрия, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака желудка, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака щитовидной железы, рака яичка, рака уротелия, рака легкого, меланомы, немеланомного рака кожи (плоскоклеточной и базальноклеточной карциномы), глиомы, рак почки (RCC), лимфомы (НХЛ или ХЛ), острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза (Т-ALL), диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, опухоли яичка происходящие из терминальных клеток, мезотелиомы, рака мочевого пузыря и рака пищевода.

В частности, СРА.9.086H4(S241P) находит применение при лечении рака предстательной железы, рака печени (HCC), колоректального рака, рака яичников, рака эндометрия, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака желудка, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака щитовидной железы, рака яичка, рака уротелия, рака легкого, меланомы, немеланомного рака кожи (плоскоклеточной и базальноклеточной карциномы), глиомы, рак почки (RCC), лимфомы (НХЛ или ХЛ), острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза (Т-ALL), диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, опухоли яичка происходящие из терминальных клеток, мезотелиомы, рака мочевого пузыря и рака пищевода.

В частности, СРА.9.083H4(S241P) находит применение при лечении рака предстательной железы, рака печени (HCC), колоректального рака, рака яичников, рака эндометрия, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака желудка, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака щитовидной железы, рака яичка, рака уротелия, рака легкого, меланомы, немеланомного рака кожи (плоскоклеточной и базальноклеточной карциномы), глиомы, рак почки (RCC), лимфомы (НХЛ или ХЛ), острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза (Т-ALL), диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, опухоли половых клеток яичка, мезотелиомы, рака мочевого пузыря и рака пищевода.

В частности, СНА.9.547.7.H4(S241P) находит применение при лечении рака предстательной железы, рака печени (HCC), колоректального рака, рака яичников, рака эндометрия, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака желудка, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака щитовидной железы, рака яичка, рака уротелия, рака легкого, меланомы, немеланомного рака кожи (плоскоклеточной и базальноклеточной карциномы), глиомы, рака почки (RCC), лимфомы (НХЛ или ХЛ), острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза (Т-ALL), диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, опухоли половых клеток яичка, мезотелиомы, рака мочевого пузыря и рака пищевода.

В частности, СНА.9.547.13.H4(S241P) находит применение при лечении рака предстательной железы, рака печени (HCC), колоректального рака, рака яичников, рака эндометрия, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака желудка, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака щитовидной железы, рака яичка, рака уротелия, рака легкого, меланомы, немеланомного рака кожи (плоскоклеточной и базальноклеточной карциномы), глиомы, рака почки (RCC), лимфомы (НХЛ или ХЛ), острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза (Т-ALL), диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, опухоли половых клеток яичка, мезотелиомы, рака мочевого пузыря и рака пищевода.

С. Монотерапия антителом к TIGIT

Антитела к TIGIT согласно изобретению особенно полезны при лечении рака в виде монотерапии. Из-за природы иммуноонкологического механизма действия TIGIT необязательно должен быть сверхэкспрессирован или коррелирован с конкретным типом рака; то есть цель состоит в том, чтобы анти-TIGIT антитела снимали подавление активации Т-клеток и NK-клеток, так что иммунная система реагировала на онкологические заболевания.

Хотя любое анти-TIGIT антитело из фиг. 53 находит применение в лечении рака (включая активацию Т-клеток, как указано ниже), СРА.9.086.H4 (S241P), СРА.9.083.H4 (S241P), СНА.9.547.7.H4 (S241P), и СНА.9.547.13.H4 (S241P), находит конкретное применение в некоторых вариантах осуществления. Фиг.

Д. Монотерапия антителом к PVRIG

Антитела к PVRIG согласно изобретению особенно полезны при лечении рака в виде монотерапии. Из-за природы иммуноонкологического механизма действия TIGIT необязательно должен быть сверхэкспрессирован или коррелирован с конкретным типом рака; то есть цель состоит в том, чтобы анти-TIGIT антитела снимают подавление Т-клеток и NK-клеток, так что иммунная система реагировала на онкологические заболевания.

В частности, СНА.7.518.1.H4 (S241P) находит применение в качестве монотерапии.

Аналогично, СНА.7.538.1.2.H4 (S241P) находит применение в качестве монотерапии в лечении рака предстательной железы, рака печени (HCC), колоректального рака, рака яичников, рака эндометрия, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака желудка, рака шейки матки, рака головы и шеи,

рака щитовидной железы, рака яичка, рака уротелия, рака легкого, меланомы, немеланомного рака кожи (плоскоклеточной и базальноклеточной карциномы), глиомы, рак почки (RCC), лимфомы (НХЛ или ХЛ), острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза (Т-ALL), диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, опухоли половых клеток яичка, мезотелиомы, рака мочевого пузыря и рака пищевода.

Е. Комбинированные терапии

Как известно в данной области техники, комбинированные терапии, содержащие терапевтическое антитело, нацеленное на иммунотерапевтическую мишень, и дополнительный терапевтический агент, специфический для данной болезни, демонстрируют большие перспективы. Например, в области иммунотерапии существует ряд многообещающих комбинированных терапий с использованием химиотерапевтического агента (или низкомолекулярного лекарственного средства или противоопухолевого антитела), или иммуноонкологического антитела.

Термины "в комбинации с" и "совместное введение" не ограничиваются введением указанных профилактических или терапевтических агентов точно в одно и то же время. Вместо этого подразумевается, что антитело и другой агент или агенты вводят в последовательности и в течение интервала времени, так что они могут действовать вместе, чтобы обеспечить преимущество, которое увеличивается по сравнению с лечением только антителом согласно данному изобретению или другим агентом, или агентом. Предпочтительно, чтобы антитело и другой агент или агенты действуют аддитивно и особенно предпочтительно, чтобы они действовали синергетически. Такие молекулы надлежащим образом присутствуют в комбинации в количествах, которые эффективны для предполагаемого назначения. Опытный врач может определить эмпирически или учитывая фармакокинетику и способы действия агентов, соответствующую дозу или дозы каждого терапевтического агента, а также соответствующий хронометраж и способы введения.

Соответственно, антитела согласно данному изобретению могут вводить одновременно с одной или более другими схемами лечения или агентами. Дополнительные схемы лечения или агенты могут использоваться для повышения эффективности или безопасности антитела. Кроме того, дополнительные схемы лечения или агенты могут использоваться для лечения одного и того же заболевания или сопутствующей патологии, а не для изменения действия антитела. Например, антитело согласно данному изобретению можно вводить пациенту вместе с химиотерапией, лучевой терапией или как химиотерапией, так и лучевой терапией.

1. Антитела к TIGIT с низкомолекулярными химиотерапевтическими веществами

Антитела к TIGIT согласно данному изобретению могут быть введены в комбинации с одним или более другими профилактическими или терапевтическими агентами, включая, но не ограничиваясь ими, цитотоксические агенты, химиотерапевтические агенты, цитокины, ростиногибирующие агенты, антигормональные агенты, ингибиторы киназы, антиангиогенные агенты, кардиопротекторы, иммуностимулирующие агенты, иммунодепрессанты, агенты, которые способствуют пролиферации гематологических клеток, ингибиторы ангиогенеза, ингибиторы протеинтирозинкиназы (РТК) или другие терапевтические агенты.

В этом контексте "химиотерапевтический агент" представляет собой химическое соединение, полезное для лечения рака. Примеры химиотерапевтических агентов включают алкилирующие агенты, такие как тиотепа или циклофосфамид, алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая альтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамида, триэтилентифосфорамида и триметилмеламин; ацетогенины (особенно буллатацин и буллатацинон); дельта-9-тетрагидроканнабинол (дронабинол, МАРИНОЛ®); бета-лапахон; лапахол; колхицины; бетулиновую кислоту; камптотецин (включая синтетический аналог топотекан (HUCAMTN®), CPT-11 (иринотекан, CAMPTOSAR®), ацетилкамптотецин, скополектин и 9-аминокамптотецин); бриостатин; каллистатин; CC-1065 (включая его синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и бизелезин); подофиллотоксин; подофиллиновую кислоту; тенипозид; криптофицины (в частности, криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические аналоги KW-2189 и CB1-TM1); элеутеробин; панкреатистатин; саркодиктин; спонгистатин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорофосфамид, эстрамустин, ифосфамид мехлорэтамин, мехлорэтамин оксид гидрохлорид, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урациловый иприт; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимустин; антибиотики, такие как энедин-новые антибиотики (например, калихеамицин, особенно калихеамицин гамма 11 и калихеамицин омега 11 (см., например, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl, 33: 183-186 (1994))); динемидин, включая динемидин А; эсперамицин; а также хромофор неокарциностатина и родственные хромопротеиновые эндиеновые антибиотические хромофоры), аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, карминомицин, карцинофилин, хромомицины, дактиномицином, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-Л-норлейцин, доксорубицин (включая морфолинодоксорубицин, цианоморфолинодоксорубицин, 2-пирролинодоксорубицин, и дезоксидоксорубицин), эпирубицин,

эзорубицин, идарубицин, марцеломицин, митомицины, такие как митомицин С, 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, триметотрексат; пуриновые аналоги, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиюгуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азациитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, ди-деоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпитиостанол, мепитиостан, тестолактон, средства, угнетающие функции надпочечников, такие как аминоглутетимид, митотан, трилостан; компенсаторы фолиевой кислоты, такие как фолиевая кислота; ацеглатон; гликозид алдофосфамида; аминоклевулиновая кислота; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бизантрин; эдатраксат; дефофамин; демеколицин; диазиквон; эльфорнитин; эллиптиум ацетат; эпотилон; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лонидайнин; майтанзиноиды, такие как майтанзин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопиданмол; нитразин; пен-тостатин; фенамет; пирарубицин; лозоксантрон; 2-этилгидразид; прокарбазин; полисахаридный комплекс PSK.RTM (JHS Natural Products, Eugene, OReg); разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; тенуазононовая кислота; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; трихотецены (особенно токсин Т-2, веракурин А, роридин А и ангиудин); уретан; виндизин (ELDISINE®, FILDESIN®); дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид ("Ara-C"); тиотепа; таксоиды, например, паклитаксел (TAXOL®; Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE®, препарат, созданный на основе альбумина наночастиц паклитаксела (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Ill.), и доцетаксел (TAXOTERE®; Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France)); хлоранбуцил; гемцитабин (GEMZAR®); 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин (VELBAN®); платина; этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкристин (ONCOVIN®); оксалиплатина; фолиевая кислота; винорелбин (NAVELBINE®); новантрон; эдатрексат; дауномицин; аминоптерин; ибандронат; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; диформетилорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; капецитабин (XELODA®); их фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из указанного выше значения, а также комбинации, двух или более из указанных выше, такие как CHOP - аббревиатура для комбинированной терапии циклофосфамидом, доксорубицином, винкристином и преднизолоном; CVP - аббревиатура для комбинированной терапии из циклофосфамида, винкристина и преднизолона; и FOLFOX - аббревиатура для схемы лечения с оксалиплатином (ELOXATIN®) в комбинации с 5-FU и лейковорином.

Согласно по меньшей мере некоторым вариантам осуществления иммунные молекулы анти-TIGIT могут использоваться в комбинации с любым из известных в данной области стандартов лечения рака (как это можно найти, например, в <http://www.cancer.gov/cancertopics>).

Таким образом, в некоторых случаях, анти-PVRIG антитела, описанные в данном документе (в частности, в том числе CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) или CHA.7.518.1.H4 (S241P)) могут быть объединены с химиотерапевтическими агентами. Аналогично, анти-TIGIT антитела, описанные в данном документе (в частности, включая CPA.9.086H4 (S241P), CPA.9.083H4 (S241P) и CHA.9.547.13 .H4 (S241P)), могут быть комбинированы с химиотерапевтическими агентами.

Кроме того, анти-PVRIG и анти-TIGIT антитела согласно изобретению могут также вводиться с другими ингибиторами или активаторами контрольных точек.

2. Комбинированная терапия антителами к TIGIT и к контрольным точкам

Как показано в данном документе, антитела к TIGIT согласно изобретению могут быть комбинированы с одним из нескольких антител к контрольным точкам. В некоторых вариантах осуществления опухоль пациента может быть оценена на экспрессию рецепторов, а результаты затем используются для информирования врача о том, какие антитела применять: PVRIG и PD-1, TIGIT и PD-1 или TIGIT и PVRIG. Данные анализы описаны ниже.

а) Анти-TIGIT антитела в комбинации с анти-PD-1 антителами

В одном варианте осуществления изобретения обеспечивает комбинации анти-TIGIT антител согласно изобретению и анти-PD-1 антител.

В одном варианте осуществления биопсия взята из опухоли у пациента с раком и диссоциирована, как известно в данной области техники для анализа FACS. Клетки окрашивают мечеными антителами к (1) TIGIT (например, используя любые описанные в данном документе или другие в данной области техники, такие как MBSA43); (2) PD-1 (например, с использованием известных в данной области техники, включая EH12.2H7, Keytruda®, Opdivo® и т.д.); (3) PD-L1 (например, с использованием известных в данной области техники, таких как BM-1, описанных в данном документе) и (4) PVR (например, с использованием известных в данной области техники, таких как SKII.4); и (5) изотипическим контрольным антителом. FACS делают, и для каждого рецептора рассчитывают процент клеток, экспрессирующих рецептор, относительно контрольного антитела. Если процент положительных клеток для TIGIT, PD-1, PD-1 и PVR составляет > 1% для всех 4 рецепторов, то пациент получает лечение антителами к TIGIT и PD-1, как описано в данном документе.

Соответственно, изобретение обеспечивает комбинации анти-TIGIT антител согласно изобретению и анти-PD-1 антител. Существует два одобренных анти-PD-1 антитела, пембролизумаб (Keytruda®) и ниволумаб (Opdivo®) и многие другие в разработке, которые могут быть использованы в комбинации с анти-TIGIT антителами согласно изобретению.

Соответственно, изобретение предусматривает конкретные комбинации: CPA.9.083.H4(S241P) (как изображено на фиг. 53 B) с пембролизумабом; CPA.9.083.H4 (S241P), как изображено на фиг. 53B с ниволумабом; CPA.9.086.H4(S241P), как изображено на фиг. 53A с пембролизумабом; CPA.9.086.H4(S241P), как показано на фиг. 53A с ниволумабом; CHA.9.547.7H4(S241P) с пембролизумабом; CHA.9.547.7H4(S241P) с ниволумабом, CHA.9.547.13.H4(S241P) с пембролизумабом и CHA.9.547.13.H4(S241P) с ниволумабом (Ссылка на перечень последовательностей).

б) Анти-TIGIT антитела в комбинации с анти-CTLA-4 антителами

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает комбинации анти-TIGIT антител согласно изобретению и анти-CTLA-4 антител. Существует два одобренных анти-CTLA-4 антитела, ипилимумаб (Yervoy®) и тремелидумаб, а также другие в разработке, которые могут использоваться в комбинации с анти-TIGIT антителами согласно изобретению.

Соответственно, изобретение обеспечивает конкретные комбинации: CPA.9.083.H4(S241P) с ипилимумабом; CPA.9.083.H4(S241P) с тремелидумабом; CPA.9.086.H4 (S241P) с ипилимумабом; CPA.9.086.H4(S241P) с тремелидумабом; CHA.9.547.7H4(S241P) с ипилимумабом; CHA.9.547.7H4(S241P) с тремелидумабом; CHA.9.547.13.H4(S241P) с ипилимумабом и CHA.9.547.13.H4(S241P) с тремелидумабом.

в) Анти-TIGIT антител в комбинации с анти-PD-L1 антителами.

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает комбинации анти-TIGIT антител согласно изобретению и анти-PD-L1 антител. Существует три одобренных анти-PD-L1 антитела, атезолизумаб (TECENTRIQ®), авелумаб (BAVENCIO®) и дурвалумаб (IMFINZI™), а также другие анти-PD-L1 антитела в разработке, которые могут использоваться в комбинации с анти-TIGIT антителами согласно изобретению.

Соответственно, данное изобретение обеспечивает конкретные комбинации: CPA.9.083.H4(S241P) с атезолизумабом; CPA.9.083.H4(S241P) с авелумабом; CPA.9.083.H4(S241P) с дурвалумабом; CPA.9.086.H4(S241P) с атезолизумабом; CPA.9.086.H4(S241P) с авелумабом; CPA.9.086.H4(S241P) с дурвалумабом; CHA.9.547.7H4(S241P) с атезолизумабом; CHA.9.547.7H4(S241P) с авелумабом; CHA.9.547.7H4(S241P) с дурвалумабом; CHA.9.547.13.H4(S241P) с атезолизумабом; CHA.9.547.13.H4(S241P) с авелумабом; и CHA.9.547.13.H4(S241P) с дурвалумабом.

г) Анти-TIGIT антитела в комбинации с Анти-LAG-3 антителами

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает комбинации анти-TIGIT антител согласно изобретению и анти-LAG-3 антител. В разработке имеется несколько анти-LAG-3 антител, включая BMS-986016 (см., международную заявку на патент № WO 2010/019570A2, включенную в данный документ посредством ссылки) GSK2831781 (см. заявку на патент США № 2016/0017037A, включенную в данный документ посредством ссылки) и клоны Merck 22D2, 11C9, 4A10 и/или 19E8 (см. WO 2016/028672A1, полностью включенную в данный документ посредством ссылки) и GSK2831781, а также другие в разработке, которые могут быть использованы в комбинации с анти-TIGIT антителами согласно изобретению.

Соответственно, изобретение обеспечивает конкретные комбинации:

CPA.9.083.H4(S241P) с BMS-986016; CPA.9.083.H4(S241P) с GSK2831781;

CPA.9.086.H4(S241P) с BMS-986016; CPA.9.086.H4(S241P) с GSK2831781;

CHA.9.547.7H4(S241P) с BMS-986016; CHA.9.547.7H4(S241P) с GSK2831781;

CHA.9.547.13.H4(S241P) с BMS-986016 и CHA.9.547.13.H4(S241P) с GSK2831781.

Соответственно, данное изобретение также обеспечивает конкретные комбинации: CPA.9.083.H4(S241P) с клонами Merck 22D2, 11C9 и/или 4A10; CPA.9.086.H4(S241P) с клонами Merck 22D2, 11C9 и/или 4A10; CHA.9.547.7H4(S241P) с клонами Merck 22D2, 11C9 и/или 4A10; CHA.9.547.13.H4(S241P) с клонами Merck 22D2, 11C9 и/или 4A10.

е) Анти-TIGIT антитела в комбинации с анти-TIM-3 антителами

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает комбинации анти-TIGIT антител согласно изобретению и анти-TIM-3 антител. В разработке имеется по меньшей мере одно анти-TIM-3 антитело, TSR-022, а также другие в разработке, которые могут использоваться в комбинации с анти-TIGIT антителами согласно изобретению.

Соответственно, изобретение обеспечивает конкретные комбинации: CPA.9.083.H4(S241P) с TSR-022; CPA.9.086.H4(S241P) с TSR-022, CHA.9.547.7H4(S241P) с TSR-022 и CHA.9.547.13.H4(S241P) с TSR-022.

ф) Анти-TIGIT антитела в комбинации с анти-BTLA антителами

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает комбинации анти-TIGIT антител согласно изобретению и анти-BTLA антител, см. WO 2011/014438, включающую посредством ссылки во

всей своей полноте, и, в частности, для CDR и полноразмерных последовательностей анти-BTLA антител, описанных в ней. Соответственно, изобретение обеспечивает конкретные комбинации: CPA.9.083.H4(S241P) с анти-BTLA антителом; CPA.9.086.H4(S241P) с анти-BTLA антителом; CHA.9.547.7H4(S241P) с анти-BTLA антителом; и CHA.9.547.13.H4(S241P) с анти-BTLA антителом.

g) Антитела к TIGIT с противоопухолевыми антителами

В некоторых вариантах осуществления анти-TIGIT антитела согласно изобретению совместно вводятся с антителами, которые, в отличие от иммуноонкологических ингибиторов/ингибиторов контрольных точек, которые обычно действуют на иммунную систему для увеличения нативного иммунного ответа пациента, вместо этого направлены против конкретного опухолевого целевого антигена (ТТА). Существует большое количество анти-ТТА антител, одобренных или разрабатываемых, которые можно комбинировать с данными антителами к TIGIT. В настоящее время одобренные антитела включают, но не ограничиваются ими, цетуксимаб, панитумумаб, нимотузумаб (все для EGFR), ритуксимаб (CD20), трастузумаб и пертузумаб (HER2), алемтузумаб (CD52), бевацизумаб (VEGF), офатумумаб (CD20), деносумаб (лиганд RANK), брентуксимаб (CD30), даратумумаб (CD38), ибритумомаб (CD20) и ипилимумаб (CTLA-4). Специфические целевые онкологические антитела в клинических испытаниях, которые могут быть комбинированы с анти-TIGIT антителами, включают, но не ограничиваются ими, Анти-CTLA4 мкАт, такие как ипилимумаб, тремелиумаб; анти-PD-1, такие как ниволумаб BMS-936558/MDX-1106/ONO-4538, AMP224, CT-011, MK-3475, анти-PDL-1 антагонисты, такие как BMS-936559/MDX-1105, MEDI4736, RG-7446/MPDL3280A; анти-LAG-3, такие как IMP-321), анти-TIM-3, анти-BTLA, анти-B7-H4, анти-B7-H3, анти-VISTA; Агонистические антитела, нацеленные на иммуностимулирующие белки, включая анти-CD40 мкАт, такие как CP-870,893, лукатумумаб, дацетузумаб; анти-CD137, такие как BMS-663513 урелумаб (анти-4-1BB, см., например, патенты США №№ 7288638 и 8962804, включенные в данный документ посредством ссылки в полном объеме); PF-05082566 утомилумаб (см., например, патенты США №№ 8821867; 8337850; и 9468678, а также публикацию международной патентной заявки № WO 2012/032433, включенные в данный документ посредством ссылки в полном объеме); анти-OX40 мкАт, такие как анти-OX40 (см., например, /029879 или WO2010096418, включенные в данный документ посредством ссылки в полном объеме); анти-GITR мкАт, такие как TRX518 (см., например, патент США № 7812135, полностью включенный в данный документ посредством ссылки); анти-CD27 мкАт, такие как варлилумаб CDX-1127 (см., например, WO 2016/145085 и публикации патентов США № US 2011/0274685 и US 2012/0213771, включенные в данный документ посредством ссылки в полном объеме) анти-ICOS мкАт (например, MEDI-570, JTX-2011 и анти-TIM3 антитела (см., например, WO 2013/006490 или публикацию патента США № 2016/0257758, включенную в данный документ посредством ссылки в полном объеме), а также моноклональные антитела к раку предстательной железы, раку яичника, раку молочной железы, раку молочной железы, раку эндометрия, множественной миеломе, меланоме, лимфомам, раку легкого, включая рак легкого, рак почки, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак мозга (см., как правило, www.clinicaltrials.gov).

3. Комбинированная терапия PVRIG и PD-1

Как показано в данном документе, антитела к PVRIG согласно изобретению могут быть комбинированы с одним из нескольких антител к контрольным точкам.

а) Анти-PVRIG антитела в комбинации с анти-PD-1 антителами

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает комбинации анти-PVRIG антител согласно изобретению и анти-PD-1 антител.

В одном варианте осуществления биопсия взята из опухоли у пациента с раком и диссоциирована, как известно в данной области техники для анализа FACS. Клетки окрашивают мечеными антителами к (1) PVRIG (как правило, с использованием CHA.7.518.1H4 (S241P), например, хотя любые из них описаны в WO 2016/134333 (в частности, любые которые связываются, даже если они не блокируются) или WO 2017/041004); (2) PD-1 (например, с использованием известных в данной области техники, включая EH12.2H7, Keytruda®, Opdivo® и т. д.); (3) PD-L1 (например, с использованием известных в данной области техники, таких как BM-1, описанных в данном документе) и (4) PVRL2 (например, с использованием известных в данной области техники, таких как TX11); и (5) изотипическое контрольное антитело. FACS делают, и для каждого рецептора рассчитывают процент клеток, экспрессирующих рецептор, относительно контрольного антитела. Если процент положительных клеток для PVRIG, PD-1, PD-L1 и PVRL2 составляет > 1% для всех 4 рецепторов, то пациент получает лечение антителами к PVRIG и PD-1, как описано в данном документе.

Существует два одобренных анти-PD-1 антитела, пембролизумаб (Keytruda®) и ниволумаб (Opdivo®) и многие другие в разработке, которые могут быть использованы в комбинации с анти-PVRIG антителами согласно изобретению.

Соответственно, изобретение обеспечивает специфические комбинации: CHA.7.518.1.H4 (S241P) (как изображено на фиг. 3) с пембролизумабом; CHA.7.518.1.H4 (S241P), как изображено на фиг. 3 с ниволумабом; CHA.7.538.1.2.H4 (S241P), как изображено на фиг. 3 с пембролизумабом и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P), как показано с ниволумабом.

b) Анти-PVRIG антитела в комбинации с анти-CTLA-4 антителами

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает комбинации анти-PVRIG антител согласно изобретению и анти-CTLA-4 антител. Существует два одобренных анти-CTLA-4 антитела, ипилимумаб (Yervoy®) и тремелиумаб, а также другие в разработке, которые могут использоваться в комбинации с анти-TIGIT антителами согласно изобретению.

Соответственно, изобретение обеспечивает конкретные комбинации: CHA.7.518.1.H4 (S241P) с ипилимумабом; CHA.7.518.1.H4 (S241P) с тремелиумабом; CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) с ипилимумабом и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) с тремелиумабом.

c) Анти-PVRIG антитела в комбинации с анти-PD-L1 антителами

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает комбинации анти-PVRIG антител согласно изобретению и анти-PD-L1 антител. Существует три одобренных анти-PD-L1 антитеа, атезолизумаб (TECENTRIQ®), авелумаб (BAVENCIO®) и дурвалумаб, а также другие анти-PD-L1 антитела в разработке, которые могут использоваться в комбинации с анти-TIGIT антителами согласно изобретению.

Соответственно, изобретение обеспечивает конкретные комбинации: CHA.7.518.1.H4 (S241P) с атезолизумабом; CHA.7.518.1.H4 (S241P) с авелумабом; CHA.7.518.1.H4 (S241P) с дурвалумабом; CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) с атезолизумабом; CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) с авелумабом и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) с дурвалумабом.

d) Анти-PVRIG антитела в комбинации с Анти-LAG-3 антителами

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает комбинации анти-PVRIG антител согласно изобретению и Анти-LAG-3 антител. В разработке имеется несколько Анти-LAG-3 антител, включая BMS-986016 (см., международную заявку на патент № WO 2010/019570A2, включенную в данный документ посредством ссылки) GSK2831781 (см. заявку на патент США № 2016/0017037A, включенную в данный документ посредством ссылки) и клоны Merck 22D2, 11C9, 4A10 и/или 19E8 (см. WO 2016/028672A1, полностью включенную в данный документ посредством ссылки) и GSK2831781, а также другие в разработке, которые могут быть использованы в комбинации с анти-PVRIG антителами согласно изобретению.

Соответственно, изобретение обеспечивает конкретные комбинации: CHA.7.518.1.H4(S241P) с BMS-986016; CHA.7.518.1.H4(S241P) с GSK2831781; CHA.7.538.1.2.H4(S241P) с BMS-986016 и CHA.7.538.1.2.H4(S241P) с GSK2831781.

Соответственно, изобретение также обеспечивает конкретные комбинации: CHA.7.518.1.H4 (S241P) с клонами Merck 22D2, 11C9 и/или 4A10 и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) с помощью клонов Merck 22D2, 11C9 и/или 4A10.

e) Анти-PVRIG антитела в комбинации с анти-TIM-3 антителами

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает комбинации анти-PVRIG антител согласно изобретению и анти-TIM-3 антител. В разработке имеется по меньшей мере одно анти-TIM-3 антитело, TSR-022, а также другие в разработке, которые могут использоваться в комбинации с анти-PVRIG антителами согласно изобретению.

Соответственно, изобретение обеспечивает конкретные комбинации: CHA.7.518.1.H4(S241P) с TSR-022 и CHA.7.538.1.2.H4(S241P) с TSR-0226.

f) Анти-PVRIG антитела в комбинации с анти-BTLA антителами

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает комбинации анти-PVRIG антител согласно изобретению и анти-BTLA антител, см. WO2011/014438, включающую посредством ссылки во всей своей полноте, и, в частности, для CDR и полноразмерных последовательностей анти-BTLA антител, описанных в ней. Соответственно, изобретение обеспечивает конкретные комбинации: CHA.7.518.1.H4 (S241P) с анти-BTLA антителом и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) с анти-BTLA антителом.

g) Антитела к PVRIG с противоопухолевыми антителами

В некоторых вариантах осуществления анти-PVRIG антитела согласно изобретению совместно вводят с антителами, которые, в отличие от иммуноонкологических ингибиторов/ингибиторов контрольных точек, которые обычно действуют на иммунную систему для увеличения нативного иммунного ответа пациента, вместо этого направлены против конкретного целевого опухолевого антигена (TTA). Существует большое количество анти-TTA антител, одобренных или разрабатываемых, которые можно комбинировать с данными антителами к PVRIG, включая CHA.7.518.1.H4(S241P) и CHA.7.538.1.2.H4(S241P). В настоящее время одобренные антитела включают, но не ограничиваются ими, цетуксимаб, панитумумаб, нимотузумаб (все для EGFR), ритуксимаб (CD20), трастузумаб и пертузумаб (HER2), алемтузумаб (CD52), бевацизумаб (VEGF), офатумумаб (CD20), деносумаб (лиганд RANK), брентуксимаб (CD30), даратумумаб (CD38), ибритумомаб (CD20) и ипилимумаб (CTLA-4). Специфические целевые онкологические антитела в клинических испытаниях, которые могут быть комбинированы с анти-TIGIT антителами, включают, но не ограничиваются ими, анти-CTLA4 мкАт, такие как ипилимумаб, тремелиумаб; анти-PD-1, такие как ниволумаб BMS-936558/MDX-1106/ONO-4538, AMP224, CT-011, MK-3475, анти-PDL-1 антагонисты, такие как BMS-936559/MDX-1105, MEDI4736, RG-7446/MPDL3280A; анти-LAG-3, такие как IMP-321), анти-TIM-3, анти-BTLA, анти-B7-H4, анти-B7-H3, анти-VISTA; агонистические ан-

титела, нацеленные на иммуностимулирующие белки, включая анти-CD40 мкАт, такие как CP-870,893, лукатумумаб, дацетугумаб; анти-CD137, такие как BMS-663513 урелумаб (анти-4-1BB, см., например, патенты США №№ 7288638 и 8962804, включенные в данный документ посредством ссылки в полном объеме); PF-05082566 утомилумаб (см, например, патенты США №№ 8821867; 8337850; и 9468678, а также публикацию международной патентной заявки № WO 2012/032433, включенные в данный документ посредством ссылки в полном объеме); анти-OX40 мкАт, такие как анти-OX40 (см, например, WO 2006/029879 или WO 010096418, включенные в данный документ посредством ссылки в полном объеме); анти-GITR мкАт, такие как TRX518 (см, например, патент США № 7812135, полностью включенный в данный документ посредством ссылки); анти-CD27 мкАт, такие как варлилумаб CDX-1127 (см, например, WO 2016/145085 и публикации патентов США № US 2011/0274685 и US 2012/0213771, включенные в данный документ посредством ссылки в полном объеме) анти-ICOS мкАт (например, MEDI-570, JTX-2011 и анти-TIM3 антитела (см., например, WO 2013/006490 или публикацию патента США № 2016/0257758, включенную в данный документ посредством ссылки в полном объеме), а также моноклональные антитела к раку предстательной железы, раку яичника, раку молочной железы, раку молочной железы, раку эндометрия, множественной миеломе, меланоме, лимфомам, раку легкого, включая рак легкого, рак почки, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак мозга (см., как правило, www.clinicaltrials.gov).

4. Комбинированная терапия PVRIG и TIGIT

Существуют конкретные комбинации анти-TIGIT и анти-PVRIG антител, которые находят применение в конкретных вариантах осуществления.

В одном варианте осуществления биопсия взята из опухоли у пациента с раком и диссоциирована, как известно в данной области техники для анализа FACS. Клетки окрашивают мечеными антителами к (1) PVRIG (как правило, с использованием CHA.7.518.1H4(S241P), например, хотя любые из них описаны в WO 2016/134333 (в частности, любые которые связываются, даже если они не блокируются) или WO 2017/041004); (2) TIGIT (например, с использованием любых описанных в данном документе или других в данной области техники, таких как MBSA43); (3) PVR (например, с использованием известных в данной области техники, таких как SKII.4) и (4) PVRL2 (например, с использованием известных в данной области техники, таких как TX11); и (5) изотипическое контрольное антитело. FACS делают, и для каждого рецептора рассчитывают процент клеток, экспрессирующих рецептор, относительно контрольного антитела. Если процент положительных клеток для PVRIG, TIGIT, PVR и PVRL2 составляет $\geq 1\%$ для всех 4 рецепторов, то пациент получает лечение антителами к PVRIG и TIGIT. Предпочтительными комбинациями в этом отношении являются CHA7.518.1.H4(S241P) и CPA.9.086.

В одном варианте осуществления антитела, содержащие наборы CDR из анти-TIGIT антитела CPA.9.086, комбинируют с антителами, содержащими наборы CDR из анти-PVRIG антитела CHA.7.518.1. В конкретном варианте осуществления антитела, содержащие последовательности VH и VL из анти-TIGIT антитела CPA.9.086, комбинируют с антителами, содержащими VL и VL, от анти-PVRIG антитела CHA.7.518.1. В одном варианте осуществления CPA.9.086.H4(S241P), как изображено на фиг. 53, комбинируют с CHA.7.518.1H4(S241P), как изображено на фиг. 3.

В одном варианте осуществления антитела, содержащие наборы CDR из анти-TIGIT антитела CPA.9.083, комбинируют с антителами, содержащими наборы CDR из анти-PVRIG антитела CHA.7.518.1. В конкретном варианте осуществления антитела, содержащие последовательности VH и VL из анти-TIGIT антитела CPA.9.083, комбинируют с антителами, содержащими VL и VL, от анти-PVRIG антитела CHA.7.518.1. В одном варианте осуществления CPA.9.086.H4(S241P) комбинируют с CHA7.518.1H4(S241P).

В одном варианте осуществления антитела, содержащие наборы CDR из анти-TIGIT антитела CPA.9.086, комбинируют с антителами, содержащими наборы CDR из анти-PVRIG антитела CHA.7.538.1.2.H4(S241P). В конкретном варианте осуществления антитела, содержащие последовательности VH и VL из анти-TIGIT антитела CPA.9.086, комбинируют с антителами, содержащими VL и VL, от анти-PVRIG антитела CHA.7.538.1.2.H4(S241P). В одном варианте осуществления CPA.9.086.H4(S241P) комбинируют с CHA7.538.1.2.H4(S241P).

В одном варианте осуществления CHA.518.1.H4(S241P) комбинируют с анти-TIGIT антителом, как указано в перечне последовательностей (со ссылкой на все антитела, перечисленные на фиг. 4 из USSN 62/513916), в частности

CPA.9.018, CPA.9.027,
CPA.9.049, CPA.9.057, CPA.9.059, CPA.9.083, CPA.9.086, CPA.9.089, CPA.9.093,
CPA.9.101, CPA.9.103, CHA.9.536.1, CHA.9.536.3, CHA.9.536.4, CHA.9.536.5, CHA.9.536.6,
CHA.9.536.7, CHA.9.536.8, CHA.9.560.1, CHA.9.560.3, CHA.9.560.4, CHA.9.560.5,
CHA.9.560.6, CHA.9.560.7, CHA.9.560.8, CHA.9.546.1, CHA.9.546.1, CHA.9.547.2,
CHA.9.547.3, CHA.9.547.4, CHA.9.547.6, CHA.9.547.7, CHA.9.547.8, CHA.9.547.9,
CHA.9.547.13, CHA.9.541.1, CHA.9.541.3, CHA.9.541.4, CHA.9.541.5, CHA.9.541.6,
CHA.9.541.7 и CHA.9.541.8

В одном варианте осуществления CPA.9.086 комбинируют с анти-PVRIG антителом, как описано в

WO 2017/041004, включая, но не ограничиваясь ими, те, которые имеют: а) последовательность HC SEQ ID NO: 5 и последовательность LC SEQ ID NO: 3 (или наборы CDR, содержащиеся в них); б) последовательность HC SEQ ID NO: 32 и последовательность LC SEQ ID NO: 33 (или наборы CDR, содержащиеся в них); и с) последовательность HC SEQ ID NO: 32 и последовательность LC SEQ ID NO: 40 (или наборы CDR, содержащиеся в них).

В некоторых вариантах осуществления комбинация содержит анти-TIGIT антитело, выбранное из группы, состоящей из CPA.9.086, CPA.9.083, CHA.9.547.7, и CHA.9.547.13, и антитело к PVRIG, выбранное из группы, состоящей из CHA7.518.1 и CHA.7.538.1.2. В некоторых вариантах осуществления комбинация содержит анти-TIGIT антитело, выбранное из группы, состоящей из CPA.9.086, CPA.9.083, CHA.9.547.7 и CHA.9.547.13, а антитело к PVRIG представляет собой CHA7.518.1. В некоторых вариантах осуществления комбинация содержит анти-TIGIT антитело, выбранное из группы, состоящей из CPA.9.086, CPA.9.083, CHA.9.547.7 и CHA.9.547.13, а антитело к PVRIG представляет собой CHA7.538.1.2. В некоторых вариантах осуществления комбинация содержит анти-TIGIT антитело CPA.9.086 и антитело к PVRIG CHA7.518.1. В некоторых вариантах осуществления комбинация содержит анти-TIGIT антитело CPA.9.083 и антитело к PVRIG CHA7.518.1. В некоторых вариантах осуществления комбинация содержит анти-TIGIT антитело CHA.9.547.7 и антитело к PVRIG CHA7.518. В некоторых вариантах осуществления комбинация содержит анти-TIGIT антитело CHA.9.547.13 и антитело к PVRIG CHA7.518.1. В некоторых вариантах осуществления комбинация содержит анти-TIGIT антитело CPA.9.086 и антитело к PVRIG CHA7.538.1.2. В некоторых вариантах осуществления комбинация содержит анти-TIGIT антитело CPA.9.083 и антитело к PVRIG CHA7.538.1.2. В некоторых вариантах осуществления комбинация содержит анти-TIGIT антитело CHA.9.547.7 и антитело к PVRIG CHA7.538.1.2. В некоторых вариантах осуществления комбинация содержит анти-TIGIT антитело CHA.9.547.13 и антитело к PVRIG CHA7.538.1.2.

На фиг. 20-24 представлены антитела к PVRIG, как описано в заявке на патент США № 15/277978, поданной 27 сентября 2016 г. Антитела к TIGIT согласно данному изобретению могут быть использованы в комбинации с антителами к PVRIG, как описано на этих фигурах, а также с теми, которые раскрыты в данной заявке.

5. Оценка лечения

Как правило, антитела согласно изобретению, отдельно или в комбинации (PVRIG с PD-1, TIGIT с PD-1 или TIGIT с PVRIG), вводят пациентам с раком, и эффективность оценивается несколькими способами, как описано в данном документе. Таким образом, в то время как могут быть проведены стандартные анализы эффективности, такие как опухолевая нагрузка, размер опухоли, оценка наличия или степени метастазирования и т.д., иммуноонкологические методы лечения можно оценивать и на основании оценок иммунного статуса. Это можно сделать несколькими способами, включая как анализы *in vitro*, так и *in vivo*. Например, может быть проведена оценка изменений иммунного статуса (например, присутствие ICOS⁺ CD4⁺ Т-клеток после лечения *in vivo*), вместе с "устарелыми" измерениями, такими как опухолевая нагрузка, размер, инвазивность, вовлеченность лимфатических узлов, метастазирование и т. д. Таким образом, можно оценить любое или все из следующего: ингибирующие эффекты PVRIG или TIGIT на активацию или пролиферацию CD4⁺ Т-клеток, активацию или пролиферацию CD8⁺ Т-клеток (CTL), CD8⁺ Т-клеточно-опосредованную цитотоксическую активность и/или CTL-опосредованное истощение популяции клеток, активность NK-клеток и NK-опосредованное истощение популяции клеток, потенцирующие эффекты PVRIG или TIGIT на дифференцировку и пролиферацию регуляторных Т-клеток и иммуносупрессию или иммунную толерантность, опосредованную регуляторными Т-клетками или миелоидными супрессорными клетками (МЛСК), и/или эффекты PVRIG или TIGIT на продуцирование провоспалительных цитокинов иммунными клетками, например, продуцирование ИЛ-2, ИФН-γ или ФНО-α при помощи Т-клеток или других иммунных клеток.

В некоторых вариантах осуществления оценку лечения проводят путем оценки пролиферации иммунных клеток, используя, например, метод разведений CFSE, внутриклеточное окрашивание клеток Ki67 иммунных эффекторных клеток и способ включения 3Н-тимидина.

В некоторых вариантах осуществления оценку лечения проводят путем оценки увеличения экспрессии гена или увеличения уровней белка, связанных с активацией, включая одного или более из следующих: CD25, CD69, CD137, ICOS, PD1, GITR, OX40 и деградуляции клеток, измеренной по поверхностной экспрессии CD 107A.

В некоторых вариантах осуществления оценку лечения проводят путем оценки количества пролиферации Т-клеток в отсутствие лечения, например, до введения антител согласно изобретению. Если после введения пациент имеет увеличенную пролиферацию Т-клеток, например, субпопуляция Т-клеток пациента пролиферирует, это свидетельствует об активации Т-клеток.

Аналогично, оценка лечения антителами согласно изобретению может быть проведена путем измерения уровней ИФН-γ пациента до введения и после введения для оценки эффективности лечения. Это может быть сделано в течение нескольких часов или суток.

В общем, анализы экспрессии генов выполняют, как известно в данной области техники (см., на-

пример, Goodkind et al., *Computers and Chem. Eng.* 29(3):589 (2005), Han et al., *Bioinform. Biol. Insights* 11/15/15 9 (Suppl. 1):29-46, Campo et al., *Nod. Pathol.* 2013 Jan; 26 suppl. 1 :S97-S110, методы измерения экспрессии генов, которые явно включены в данный документ посредством ссылки.

В общем, измерения экспрессии белка также выполняются аналогичным образом, как известно в данной области техники, см., например, Wang et al., *Recent Advances in Capillary Electrophoresis-Based Proteomic Techniques for Biomarker Discovery*, *Methods. Mol. Biol.* 2013:984:1-12; Taylor et al, *BioMed Res. Volume* 2014, Article ID 361590, 8 pages, Becerk et al., *Mutat. Res* 2011 June 17:722(2): 171-182, методы измерения которых явно включены посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления оценка лечения проводится путем оценки цитотоксической активности, измеренной с помощью определения жизнеспособности целевых клеток путем оценки многочисленных параметров клеток, таких как активность ферментов (включая активность протеазы), проницаемость клеточной мембраны, клеточную адгезию, продуцирование АТФ, продуцирование коферментов и активность захвата нуклеотидов. Конкретные примеры этих анализов включают, но не ограничиваются ими, окрашивание трипановым синим или PI (пропидий йодидом), способ высвобождения ⁵¹Cr или ³⁵S, активность лактат дегидрогеназы (LDH), анализы MTT и/или WST, анализ Calcein-AM, анализ на основе люминесценции и другие.

В некоторых вариантах осуществления оценку лечения проводят путем оценки активности Т-клеток, измеряемой продуцированием цитокинов, измеряют или внутриклеточно в супернатанте культуры, используя цитокины, включая, но не ограничиваясь ими, ИФН-γ, ФНО-α, ГМ-КСФ, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-10, ИЛ-13 с использованием хорошо известных методов.

Соответственно, оценка лечения может быть проведена с использованием анализов, которые оценивают одно или более из следующего: (i) увеличение иммунного ответа, (ii) увеличение активации αβ и/или γδ Т-клеток, (iii) увеличение цитотоксической активности Т-клеток (iv) увеличение активности NK и/или NKT-клеток, (v) облегчение подавления αβ и/или γδ Т-клеток, (vi) увеличение секреции провоспалительных цитокинов, (vii) увеличение секреции ИЛ-2; (viii) увеличение продуцирования интерферона-γ, (ix) увеличение в ответа Th1, (x) уменьшение ответа Th2, (xi) уменьшение количества или уничтожение клеток и/или активности по меньшей мере одной из регуляторных Т-клеток (Treg).

Анализы для измерения эффективности

В некоторых вариантах осуществления активацию Т-клеток оценивают, используя реакцию смешанной культуры лимфоцитов (СКЛ-реакция), как описано в примерах. Увеличение активности указывает на иммуностимулирующую активность. Соответствующие увеличения активности описаны ниже.

В одном варианте осуществления анализ сигнального пути измеряет увеличение или уменьшение иммунного ответа, как измерено для примера путем фосфорилирования или дефосфорилирования различных факторов, или путем измерения других посттрансляционных модификаций. Увеличение активности указывает на иммуностимулирующую активность. Соответствующие увеличения активности описаны ниже.

В одном варианте осуществления анализ сигнального пути измеряет увеличение или уменьшение активации αβ и/или γδ Т-клеток, как измерено для примера по секреции цитокинов или пролиферации, или изменениям экспрессии маркеров активации как, например, CD137, CD107a, PD1 и т. д. Увеличение активности указывает на иммуностимулирующую активность. Соответствующие увеличения активности описаны ниже.

В одном варианте осуществления анализ сигнального пути измеряет увеличение или уменьшение активности цитотоксических Т-клеток, как измерено для примера путем прямого уничтожения клеток-мишеней, например, для раковых клеток или по секреции цитокинов или по пролиферации, или по изменениям экспрессии маркеров активации, как, например, CD137, CD107a, PD1 и т.д. Увеличение активности указывает на иммуностимулирующую активность. Соответствующие увеличения активности описаны ниже.

В одном варианте осуществления анализ сигнального пути измеряет увеличение или уменьшение активности NK и/или NKT-клеток, как измерено для примера путем прямого уничтожения клеток-мишеней, например, для раковых клеток или по секреции цитокинов или по пролиферации, или по изменениям экспрессии маркеров активации, как, например, CD107a, и т. д. Увеличение активности указывает на иммуностимулирующую активность. Соответствующие увеличения активности описаны ниже.

В одном варианте осуществления анализ сигнального пути измеряет увеличение или уменьшение подавления αβ и/или γδ Т-клеток, как измерено для примера по секреции цитокинов или по пролиферации, или по изменениям экспрессии маркеров активации, как, например, CD137, CD107a, PD1 и т.д. Увеличение активности указывает на иммуностимулирующую активность. Соответствующие увеличения активности описаны ниже.

В одном из вариантов осуществления анализ сигнального пути измеряет увеличение или уменьшение секреции провоспалительных цитокинов, как измерено, например, методом ИФА или Luminex, или с использованием основанного на использовании гранул мультиплексного анализа, или путем внутриклеточного окрашивания и анализа FACS, или Alispot и т.д. Увеличение активности указывает на иммуно-

стимулирующую активность. Соответствующие увеличения активности описаны ниже.

В одном из вариантов осуществления анализ сигнального пути измеряет увеличение или уменьшение секреции ИЛ-2, как измерено, например, методом ИФА или Luminex, или с использованием основанного на использовании гранул мультиплексного анализа или путем внутриклеточного окрашивания и анализа FACS, или Alisport и т.д. Увеличение активности указывает на иммуностимулирующую активность. Соответствующие увеличения активности описаны ниже.

В одном из вариантов осуществления анализ сигнального пути измеряет увеличение или уменьшение продуцирования интерферона- γ , как измерено, например, методом ELISA или Luminex, или с использованием основанного на использовании гранул мультиплексного анализа или путем внутриклеточного окрашивания и анализа FACS, или Alisport и т.д. Увеличение активности указывает на иммуностимулирующую активность. Соответствующие увеличения активности описаны ниже.

В одном варианте осуществления анализ сигнального пути измеряет увеличение или уменьшение ответа Th1, как измерено для примера по секреции цитокинов, или по изменениям экспрессии маркеров активации. Увеличение активности указывает на иммуностимулирующую активность. Соответствующие увеличения активности описаны ниже.

В одном варианте осуществления анализ сигнального пути измеряет увеличение или уменьшение ответа Th2, как измерено для примера по секреции цитокинов, или по изменениям экспрессии маркеров активации. Увеличение активности указывает на иммуностимулирующую активность. Соответствующие увеличения активности описаны ниже.

В одном варианте осуществления анализ сигнального пути измеряет увеличение или уменьшение количества клеток и/или активности по меньшей мере одной из регуляторных Т-клеток (Treg), как измерено, например, проточной цитометрией или ИГХ. Снижение ответа указывает на иммуностимулирующую активность. Соответствующие снижения такие же, как и для увеличения, описанные ниже.

В одном варианте осуществления анализ сигнального пути измеряет увеличение или уменьшение количества клеток макрофагов M2, как измерено, например, проточной цитометрией или ИГХ. Снижение ответа указывает на иммуностимулирующую активность. Соответствующие снижения такие же, как и для увеличения, описанные ниже.

В одном варианте осуществления анализ сигнального пути измеряет увеличение или уменьшение протуморогенной активности макрофагов M2, как измерено, например, по секреции цитокинов или по изменениям экспрессии маркеров активации. Снижение ответа указывает на иммуностимулирующую активность. Соответствующие снижения такие же, как и для увеличения, описанные ниже.

В одном варианте осуществления анализ сигнального пути увеличивает или уменьшает увеличение нейтрофилов N2, как измерено, например, проточной цитометрией или ИГХ. Снижение ответа указывает на иммуностимулирующую активность. Соответствующие снижения такие же, как и для увеличения, описанные ниже.

В одном варианте осуществления анализ сигнального пути измеряет увеличение или уменьшение протуморогенной активности нейтрофилов N2, как измерено, например, по секреции цитокинов или по изменениям экспрессии маркеров активации. Снижение ответа указывает на иммуностимулирующую активность. Соответствующие сокращения такие же, как и для увеличения, описанные ниже.

В одном варианте осуществления анализ сигнального пути измеряет увеличение или уменьшение ингибирования активации Т-клеток, как измерено, например, по секреции цитокинов или по пролиферации, или по изменениям экспрессии маркеров активации, как, например, CD137, CD107a, PD1 и т.д. Увеличение активности указывает на иммуностимулирующую активность. Соответствующие увеличения активности описаны ниже.

В одном варианте осуществления анализ сигнального пути измеряет увеличение или уменьшение активности ингибирования активации CTL, как измерено, например, путем прямого уничтожения клеток-мишеней, например, для раковых клеток или по секреции цитокинов, или по пролиферации, или по изменениям экспрессии маркеров активации, как, например, CD137, CD107a, PD1 и т.д. Увеличение активности указывает на иммуностимулирующую активность. Соответствующие увеличения активности описаны ниже.

В одном варианте осуществления анализ сигнального пути измеряет увеличение или уменьшение истощения $\text{t}\beta$ и/или $\gamma\delta$ Т-клеток, как измерено, например, по изменениям экспрессии маркеров активации. Снижение ответа указывает на иммуностимулирующую активность. Соответствующие снижения такие же, как и для увеличения, приведены ниже.

В одном варианте осуществления анализ сигнального пути измеряет увеличение или уменьшение ответа $\alpha\beta$ и/или $\gamma\delta$ Т-клеток, как измерено, например, по секреции цитокинов или по пролиферации, или по изменениям экспрессии маркеров активации, как, например, CD137, CD107a, PD1 и т.д. Увеличение активности указывает на иммуностимулирующую активность. Соответствующие увеличения активности описаны ниже.

В одном варианте осуществления анализ сигнального пути измеряет увеличение или уменьшение стимуляции антигенспецифических ответов памяти, как измерено, например, по секреции цитокинов или

по пролиферации, или по изменениям экспрессии маркеров активации, как, например, CD45RA, CCR7 и т.д. Увеличение в активности указывает на иммуностимулирующую активность. Соответствующие увеличения активности описаны ниже.

В одном варианте осуществления анализ сигнального пути измеряет увеличение или уменьшение апоптоза или лизиса раковых клеток, как измерено для примера с помощью анализов цитотоксичности, например, МТТ, высвобождения Cr, Calcine AM или анализов на основе проточной цитометрии, как, например, разведение CFSE или окрашивание пропидий йодидом и т.д. Увеличение активности указывает на иммуностимулирующую активность. Соответствующие увеличения активности описаны ниже.

В одном варианте осуществления анализ сигнального пути измеряет увеличение или уменьшение стимуляции цитотоксического или цитостатического воздействия на раковые клетки, как измерено, например, с помощью анализов цитотоксичности, таких как, например МТТ, высвобождения Cr, Calcine AM или анализов на основе проточной цитометрии, как, например, разведение CFSE или окрашивание пропидий йодидом и т.д.

Увеличение активности указывает на иммуностимулирующую активность. Соответствующие увеличения активности описаны ниже.

В одном варианте осуществления анализ сигнального пути измеряет увеличение или уменьшение прямого уничтожения раковых клеток, как измерено, например, с помощью анализов цитотоксичности, например, МТТ, высвобождения Cr, Calcine AM или анализов на основе проточной цитометрии, как, например, разведение CFSE или окрашивание пропидий йодидом и т.д. Увеличение активности указывает на иммуностимулирующую активность. Соответствующие увеличения активности описаны ниже.

В одном варианте осуществления анализ сигнального пути измеряет увеличение или уменьшение активности Th17, как измерено, например, по секреции цитокинов или по пролиферации, или по изменениям экспрессии маркеров активации. Увеличение активности указывает на иммуностимулирующую активность. Соответствующие увеличения активности описаны ниже.

В одном варианте осуществления анализ сигнального пути измеряет увеличение или уменьшение индукции комплементзависимой цитотоксичности и/или антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности, как измерено для примера с помощью анализов цитотоксичности, таких как, например, МТТ, высвобождение Cr, Calcine AM или с помощью анализа на основе проточной цитометрии, как, например, разведение CFSE или окрашивание пропидий йодидом и т. д. Увеличение активности указывает на иммуностимулирующую активность. Соответствующие увеличения активности описаны ниже.

В одном варианте осуществления активацию Т-клеток измеряют, например, путем прямого уничтожения клеток-мишеней, например, для раковых клеток или по секреции цитокинов или по пролиферации, или по изменениям экспрессии маркеров активации, как, например, CD137, CD107a, PD1 и т. д. Для Т-клеток увеличение пролиферации, клеточно-поверхностных маркеров активации (например, CD25, CD69, CD137, PD1), цитотоксичности (способность убивать клетки-мишени) и продуцирования цитокинов (например, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИФН- γ , ФНО- α , ИЛ-10, ИЛ-17A) будет свидетельствовать об иммунной модуляции, которая согласуется с усилением уничтожения раковых клеток.

В одном варианте осуществления активацию NK-клеток измеряют, например, путем прямого уничтожения клеток-мишеней, как, например, раковых клеток или по секреции цитокинов, или по изменениям экспрессии маркеров активации, как, например, для CD107a и т. д. Для NK-клеток увеличение пролиферации, цитотоксичности (способность уничтожать клетки-мишени и повышать экспрессию CD107a, гранзима и перфорина), продуцирования цитокинов (например, ИФН- γ и ФНО) и экспрессии рецептора клеточной поверхности (например, CD25) будет показателем иммунной модуляции, которая согласуется с усилением уничтожения раковых клеток.

В одном варианте осуществления активацию $\gamma\delta$ Т-клеток измеряют, например, по секреции цитокинов или пролиферации, или изменениям экспрессии маркеров активации.

В одном варианте осуществления активация клеток Th1 измеряется, например, по секреции цитокинов или изменениям экспрессии маркеров активации.

Соответствующее увеличение в активности или ответе (или уменьшение, если это уместно, как указано выше), представляет собой увеличение по меньшей мере на около 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95% или от 98 до 99% от сигнала в стандартном образце или контрольных образцах, например, тестовых образцах, которые не содержат анти-PVRIG антитела согласно изобретению. Конкретные увеличения активности изображены на фиг. 27-34. Например, в отношении увеличения пролиферации Т-клеток CHA.7.518.1.H4 (S241P) демонстрирует увеличение примерно на 60%, а CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) демонстрирует увеличение на 47%; соответствующие увеличения показаны как в пролиферации Т-клеток, так и в ИФН- γ от около 10 до 70%, причем от 20 до 60% также находит применение.

Аналогично, увеличение по меньшей мере в один, два, три, четыре или пять раз по сравнению со стандартным или контрольным образцами продемонстрировало эффективность.

XII. Перечень вариантов осуществления изобретения

1. Композиция, содержащая антигенсвязывающий домен, который связывается с TIGIT человека (SEQ ID NO: 97), содержащий:

- а) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 160; и
- б) вариабельный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 165.
2. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что указанная композиция представляет собой антитело, содержащее:
 - а) тяжелую цепь, содержащую VH-CH1-шарнир-CH2-CH3, при этом указанный VH содержит SEQ ID NO: 160; и
 - б) легкую цепь, содержащую VL-VC, при этом указанный VL, содержащую SEQ ID NO: 165, и VC представляет собой или каппа или лямбда.
3. Композиция по п.2, отличающаяся тем, что последовательность CH1-шарнир-CH2-CH3 выбрана из IgG1, IgG2 и IgG4 человека и их вариантов.
4. Композиция по п.2 или 3, отличающаяся тем, что указанная тяжелая цепь имеет SEQ ID NO: 164 и указанная легкая цепь имеет SEQ ID NO: 169.
5. Композиция по любому из пп.2-4, дополнительно содержащая второе антитело, которое связывается с рецепторным белком контрольной точки человека.
6. Композиция по п.5, отличающаяся тем, что указанное второе антитело связывает PD-1 человека.
7. Композиция по п.5, отличающаяся тем, что указанное второе антитело связывает PVRIG человека (SEQ ID NO: 2).
8. Композиция по п.7, отличающаяся тем, что указанное второе антитело содержит антигенсвязывающий домен, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 5, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 10.
9. Композиция по п.7, отличающаяся тем, что тяжелая цепь указанного второго антитела имеет SEQ ID NO: 9, и легкая цепь указанного второго антитела имеет SEQ ID NO: 14.
10. Композиция нуклеиновой кислоты, содержащая:
 - а) первую нуклеиновую кислоту, кодирующую вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 160; и
 - б) вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую вариабельный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 165.
11. Композиция нуклеиновой кислоты по п.10, отличающаяся тем, что указанная первая нуклеиновая кислота кодирует тяжелую цепь, содержащую VH-CH1-шарнир-CH2-CH3, при этом указанный VH содержит SEQ ID NO: 160; и указанная вторая нуклеиновая кислота кодирует легкую цепь, содержащую VL-VC, при этом указанный VL, содержащий SEQ ID NO: 165, и VC представляет собой домен лямбда.
12. Композиция вектора экспрессии, содержащая первый вектор экспрессии, содержащий указанную первую нуклеиновую кислоту по п.10 или 11, и второй вектор экспрессии, содержащий указанную вторую нуклеиновую кислоту по п.10 или 11 соответственно.
13. Композиция вектора экспрессии, содержащая вектор экспрессии, содержащий указанную первую нуклеиновую кислоту по п.10 или 11 и указанную вторую нуклеиновую кислоту по п.10 или 11 соответственно.
14. Клетка-хозяин, содержащая указанную композицию вектора экспрессии по п.12 или 13.
15. Способ получения анти-TIGIT антитела, включающий:
 - а) культивирование указанной клетки-хозяина по п.14 в условиях, когда указанное антитело экспрессируется; и
 - б) выделение указанного антитела.
16. Способ лечения рака путем активации Т-клеток, включающий введение композиции по любому из пп.1-9.
17. Композиция, содержащая антигенсвязывающий домен, который связывается с TIGIT человека (SEQ ID NO: 97), содержащий:
 - а) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 150; и
 - б) вариабельный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 155.
18. Композиция по п.17, отличающаяся тем, что указанная композиция представляет собой антитело, содержащее:
 - а) тяжелую цепь, содержащую VH-CH1-шарнир-CH2-CH3, при этом указанный VH содержит SEQ ID NO: 150; и
 - б) легкую цепь, содержащую VL-VC, при этом указанный VL, содержащую SEQ ID NO: 159, и VC представляет собой или каппа, или лямбда.
19. Композиция по п.18, отличающаяся тем, что последовательность CH1-шарнир-CH2-CH3 выбрана из IgG1, IgG2 и IgG4 человека и их вариантов.
20. Композиция по п.17 или 18, отличающаяся тем, что указанная тяжелая цепь имеет SEQ ID NO: 154 и указанная легкая цепь имеет SEQ ID NO: 159.
21. Композиция по любому из пп.17-20, дополнительно содержащая второе антитело, которое связывается с рецепторным белком контрольной точки человека.
22. Композиция по п.21, отличающаяся тем, что указанное второе антитело связывает PD-1 человека.

23. Композиция по п.21, отличающаяся тем, что указанное второе антитело связывает PVRIG человека (SEQ ID NO:2).
24. Композиция по п.23, отличающаяся тем, что указанное второе антитело содержит антигенсвязывающий домен, содержащий переменный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 5, и переменный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 10.
25. Композиция по п.23, отличающаяся тем, что тяжелая цепь указанного второго антитела имеет SEQ ID NO: 9 и легкая цепь указанного второго антитела имеет SEQ ID NO: 14.
26. Композиция нуклеиновой кислоты, содержащая:
- первую нуклеиновую кислоту, кодирующую переменный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 150; и
 - вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую переменный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 155.
27. Композиция нуклеиновой кислоты по п.26, отличающаяся тем, что указанная первая нуклеиновая кислота кодирует тяжелую цепь, содержащую VH-CH1-шарнир-CH2-CH3, при этом указанный VH содержит SEQ ID NO: 150; и указанная вторая нуклеиновая кислота кодирует легкую цепь, содержащую VL-VC, при этом указанный VL, содержащий SEQ ID NO: 155, и VC представляет собой домен ламбда.
28. Композиция вектора экспрессии, содержащая первый вектор экспрессии, содержащий указанную первую нуклеиновую кислоту по п.26 или 27, и второй вектор экспрессии, содержащий указанную вторую нуклеиновую кислоту по п.26 или 27 соответственно.
29. Композиция вектора экспрессии, содержащая вектор экспрессии, содержащий указанную первую нуклеиновую кислоту по п.26 или 27 и указанную вторую нуклеиновую кислоту по п.26 или 27 соответственно.
30. Клетка-хозяин, содержащая указанную композицию вектора экспрессии по п.27 или 28.
31. Способ получения анти-TIGIT антитела, включающий:
- культивирование указанной клетки-хозяина по п.30 в условиях, когда указанное антитело экспрессируется; и
 - выделение указанного антитела.
32. Способ лечения рака путем активации Т-клеток, включающий введение композиции по любому из пп.17-25.
33. Антитело, содержащее:
- тяжелую цепь, имеющую SEQ ID NO: 9; и
 - легкую цепь, имеющую SEQ ID NO: 14.
34. Антитело по п.33, дополнительно содержащее второе антитело, которое связывается с рецепторным белком контрольной точки человека.
35. Композиция по п.34, отличающаяся тем, что указанное второе антитело связывает PD-1 человека.
36. Композиция по п.34, отличающаяся тем, что указанное второе антитело связывает TIGIT человека (SEQ ID NO:97).
37. Композиция по п.36, отличающаяся тем, что указанное второе антитело содержит антигенсвязывающий домен, содержащий переменный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 160, и переменный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 165.
38. Композиция по п.36, отличающаяся тем, что тяжелая цепь указанного второго антитела имеет SEQ ID NO: 164 и легкая цепь указанного второго антитела имеет SEQ ID NO: 169.
39. Композиция нуклеиновой кислоты, содержащая:
- первую нуклеиновую кислоту, кодирующую SEQ ID NO: 9; и
 - вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую SEQ ID NO: 14.
40. Композиция вектора экспрессии, содержащая первый вектор экспрессии, содержащий указанную первую нуклеиновую кислоту по п.39, и второй вектор экспрессии, содержащий указанную вторую нуклеиновую кислоту по п.39.
41. Композиция вектора экспрессии, содержащая вектор экспрессии, содержащий указанную первую нуклеиновую кислоту по п.39 и указанную вторую нуклеиновую кислоту по п.39.
42. Клетка-хозяин, содержащая указанную композицию вектора экспрессии по п.41.
43. Способ получения анти-PVRIG антитела, включающий:
- культивирование указанной клетки-хозяина по п.42 в условиях, когда указанное антитело экспрессируется; и
 - выделение указанного антитела.
44. Способ лечения рака путем активации Т-клеток, включающий введение антитела по п.33.
45. Антитело, содержащее:
- тяжелую цепь, имеющую SEQ ID NO: 19; и
 - легкую цепь, имеющую SEQ ID NO: 24.
46. Антитело по п.45, дополнительно содержащее второе антитело, которое связывается с белком рецептора контрольной точки человека.

47. Композиция по п.46, отличающаяся тем, что указанное второе антитело связывает PD-1 человека.

48. Композиция по п.46, отличающаяся тем, что указанное второе антитело связывает TIGIT человека (SEQ ID NO: 97).

49. Композиция по п.48, отличающаяся тем, что указанное второе антитело содержит антигенсвязывающий домен, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 160, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 165.

50. Композиция по п.49, отличающаяся тем, что тяжелая цепь указанного второго антитела имеет SEQ ID NO: 164, и легкая цепь указанного второго антитела имеет SEQ ID NO: 169.

51. Композиция нуклеиновой кислоты, содержащая:

а) первую нуклеиновую кислоту, кодирующую SEQ ID NO: 19; и

б) вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую SEQ ID NO: 24.

52. Композиция вектора экспрессии, содержащая первый вектор экспрессии, содержащий указанную первую нуклеиновую кислоту по п.51, и второй вектор экспрессии, содержащий указанную вторую нуклеиновую кислоту по п.51.

53. Композиция вектора экспрессии, содержащая вектор экспрессии, содержащий указанную первую нуклеиновую кислоту по п.51 и указанную вторую нуклеиновую кислоту по п.51.

54. Клетка-хозяин, содержащая указанную композицию вектора экспрессии по п.53.

55. Способ получения анти-TIGIT антитела, включающий:

а) культивирование указанной клетки-хозяина по п.54 в условиях, когда указанное антитело экспрессируется; и

б) выделение указанного антитела.

56. Способ лечения рака путем активации Т-клеток, включающий введение антитела по п.45.

57. Способ, включающий:

а) обеспечение популяции клеток из образца опухоли от пациента;

б) окрашивание указанной популяции мечеными антителами, которые связывают:

i) белок TIGIT;

ii) белок PVR;

iii) белок PD-1;

iv) белок PD-L1 и

v) соответствующий изотипический контроль для антител в i)-iv);

с) проведение сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS);

д) для каждого из TIGIT, PVR, PD-1 и PD-L1, определение процентного содержания клеток в указанной популяции, которые экспрессируют белок относительно указанного изотипического контрольного антитела;

при этом, если процент положительных клеток составляет > 1% для всех 4 рецепторов,

е) введение антител к TIGIT и PD-1 указанному пациенту.

58. Способ по п.57, отличающийся тем, что указанное антитело к TIGIT представляет собой CPA.9.086.

59. Способ по п.57 или 58, отличающийся тем, что указанное антитело к PD-1 выбирают из пембrolизумаба и ниволумаба.

60. Способ, включающий:

а) обеспечение популяции клеток из образца опухоли от пациента;

б) окрашивание указанной популяции мечеными антителами, которые связывают:

i) белок PVRIG;

ii) белок PVRL2;

iii) белок PD-1;

iv) белок PD-L1 и

v) соответствующий изотипический контроль для антител в i)-iv);

с) проведение сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS);

д) для каждого из PVRIG, PVRL2, PD-1 и PD-L1, определение процентного содержания клеток в указанной популяции, которые экспрессируют белок относительно указанного изотипического контрольного антитела;

при этом, если процент положительных клеток составляет > 1% для всех 4 рецепторов,

е) введение антител к PVRIG и PD-1 указанному пациенту.

61. Способ по п.60, отличающийся тем, что указанное антитело к PVRIG представляет собой CNA.7.518.1.H4 (S241P).

62. Способ по п.60 или 61, отличающийся тем, что указанное антитело к PD-1 выбирают из пембrolизумаба и ниволумаба.

63. Способ, включающий:

а) обеспечение популяции клеток из образца опухоли от пациента;

- b) окрашивание указанной популяции мечеными антителами, которые связывают:
 - i) белок PVRIG;
 - ii) белок PVRL2;
 - iii) белок TIGIT;
 - iv) белок PVR и
 - v) изотипический контроль;
 - c) проведение сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS);
 - d) для каждого из PVRIG, PVRL2, TIGIT и PVR, определение процентного содержания клеток в указанной популяции, которые экспрессируют белок относительно указанного изотипического контрольного антитела;
 - при этом, если процент положительных клеток составляет $> 1\%$ для всех 4 рецепторов,
 - e) введение антител к PVRIG и TIGIT указанному пациенту.
64. Способ по п.63, отличающийся тем, что указанное антитело к PVRIG представляет собой CHA.7.518.1.H4 (S241P).
65. Способ по п.63 или 64, отличающийся тем, что указанное антитело к TIGIT представляет собой CPA9.086.
66. Композиция, содержащая антигенсвязывающий домен, который связывается с TIGIT человека (SEQ ID NO: 97), содержащий:
- a) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 560; и
 - b) вариабельный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 565.
67. Композиция по п.66, отличающаяся тем, что указанная композиция представляет собой антитело, содержащее:
- a) тяжелую цепь, содержащую VH-CH1-шарнир-CH2-CH3, при этом указанный VH содержит SEQ ID NO: 560; и
 - b) легкую цепь, содержащую VL-VC, при этом указанный VL, содержащую SEQ ID NO: 565, и VC представляет собой или каппа, или лямбда.
68. Композиция по п.67, отличающаяся тем, что последовательность CH1-шарнир-CH2-CH3 выбрана из IgG1, IgG2 и IgG4 человека и их вариантов.
69. Композиция по п.67 или 68, отличающаяся тем, что указанная тяжелая цепь имеет SEQ ID NO: 564 и указанная легкая цепь имеет SEQ ID NO: 569.
70. Композиция по любому из пп.67-69, дополнительно содержащая второе антитело, которое связывается с рецепторным белком контрольной точки человека.
71. Композиция по п.70, отличающаяся тем, что указанное второе антитело связывает PD-1 человека.
72. Композиция по п.70, отличающаяся тем, что указанное второе антитело связывает PVRIG человека (SEQ ID NO:2).
73. Композиция по п.72, отличающаяся тем, что указанное второе антитело содержит антигенсвязывающий домен, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 5, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 10.
74. Композиция по п.72, отличающаяся тем, что тяжелая цепь указанного второго антитела имеет SEQ ID NO: 9 и легкая цепь указанного второго антитела имеет SEQ ID NO: 14.
75. Композиция нуклеиновой кислоты, содержащая:
- a) первую нуклеиновую кислоту, кодирующую вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 560; и
 - b) вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую вариабельный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 565.
76. Композиция нуклеиновой кислоты по п.75, отличающаяся тем, что указанная первая нуклеиновая кислота кодирует тяжелую цепь, содержащую VH-CH1-шарнир-CH2-CH3, при этом указанный VH содержит SEQ ID NO: 560; и указанная вторая нуклеиновая кислота кодирует легкую цепь, содержащую VL-VC, при этом указанный VL, содержащий SEQ ID NO: 565, и VC представляет собой домен лямбда.
77. Композиция вектора экспрессии, содержащая первый вектор экспрессии, содержащий указанную первую нуклеиновую кислоту по п.75 или 76, и второй вектор экспрессии, содержащий указанную вторую нуклеиновую кислоту по п.75 или 76 соответственно.
78. Композиция вектора экспрессии, содержащая вектор экспрессии, содержащий указанную первую нуклеиновую кислоту по п.75 или 76 и указанную вторую нуклеиновую кислоту по п.75 или 76 соответственно.
79. Клетка-хозяин, содержащая указанную композицию вектора экспрессии по п.77 или 78.
80. Способ получения анти-TIGIT антитела, включающий:
- a) культивирование указанной клетки-хозяина по п.79 в условиях, когда указанное антитело экспрессируется; и
 - b) выделение указанного антитела.
81. Способ лечения рака путем активации Т-клеток, включающий введение композиции по любому

из пп.66-74.

ХIII. Примеры

Ссылка сделана на PCT/US2016/18809, поданный 19 февраля 2016 г., под названием "PVRIG ANTI-BODIES AND METHODS OF TREATMENT", прямо включенный в данный документ посредством ссылки в полном объеме и, в частности, для включения примеров 1-5, 7-8, 11-13, 16-20 и 26-28, а также прилагаемых фигур.

А. Пример 1: Исследования связывания PVR, PVRL2 и PVRL3 с PVRIG, DNAM и TIGIT методом поверхностного плазмонного резонанса

Материалы и способы

Все эксперименты проводили с использованием прибора ProteOn XPR 36 при 22°C.

Стадия 1:

Поверхность высокой плотности из поликлонального антитела против fc человека (Invitrogen H10500) была подготовлена на всех шести дорожках чипа GLC с использованием биосенсора ProteOn XPR 36. Стадия активации для поверхности антитела анти-fc человека происходила в направлении горизонтального потока, в то время как этап иммобилизации для пкАт высокой плотности происходил в вертикальном направлении потока. Стадия блокирования происходила как в вертикальном, так и в горизонтальном положении, так что горизонтальные "промежуточные точки" могут использоваться в качестве опорных поверхностей. В среднем на каждой полосе было иммобилизовано в среднем около 4400 RU козьего античеловеческого пкАт.

Стадия 2:

Для каждого цикла три разных партии слитого белка PVRIG человека (человеческий fc, GenScript партии 451, 448, 125), слитого белка DNAM-1 человека (человеческий фактор, R&D Systems), слитого белка TIGIT человека (человеческий фактор, R&D Systems) и контрольного IgG человека (Синагис) захватывали на разных вертикальных полосах в течение двух минут при концентрации 2 мкг/мл. PVR, две партии PVRL2 и PVRL3 вводили в горизонтальном направлении потока в шести разных концентрациях по всем шести захваченным лигандам при разных циклах захвата лигандов. Инъекции длились 2 мин, после чего 10 мин диссоциации при скорости потока 50 мкл/мин. Диапазон концентраций PVR составлял 1,4 нМ-332 нМ в 3-кратных сериях разведений, обе партии PVRL2 вводили в диапазоне концентраций 1,3 нМ-322 нМ в 3-кратных сериях разведений и PVRL3 вводили в диапазоне концентраций 1,4 нМ-334 нМ в 3-кратных сериях разведений. Все белковые реагенты готовили в подвижном буфере, который представлял собой дегазированный буфер PBS с 0,05% Tween 20 и 0,01% BSA. Поверхности захвата с антителом анти-fc человека регенерировали двумя 30-секундными промывками 146 мМ фосфорной кислоты после каждого цикла.

Стадия 3:

Данные сенсограмм связывания аналитов с каждым захваченным лигандом обрабатывались и приводились с учетом контроля с использованием ProteOn Manager версии 3.1.0.6 с использованием ссылки на промежуточные точки и предварительного введения рабочего буфера, идентичного введению аналита.

Результаты

а) PVR: слабо связывается с захваченными DNAM-1 и TIGIT и не демонстрирует связывания со всеми тремя партиями PVRIG и с контрольным IgG. Не было собрано достаточно информации для оценки KD взаимодействия PVR с DNAM-1 и TIGIT (данные не показаны).

б) PVRL2: обе партии PVRL2 продемонстрировали связывание со всеми тремя партиями PVRIG и DNAM-1, но минимальное или отсутствие связывания с TIGIT и никакого связывания с контрольным IgG. Сенсорграммы показали сложную кинетику, поэтому константы связывания не могли быть оценены (данные не показаны).

в) PVRL3: показано минимальное связывание с TIGIT и отсутствие связывания с другими белками (данные не показаны).

В. Пример 2: Влияние нокдауна (KD) PVRIG и анти-FVRIG антитела на функции TIL, специфических к меланоме человека

Целью этих анализов является оценка функциональной способности PVRIG в TIL человеческого происхождения, измеряемую по маркерам активации и секреции цитокинов, при совместном культивировании с клетками-мишенями меланомы.

1. Пример 2(1):

Было оценено влияние анти-PVRIG антитела (CPA.7.021), которое, как было показано, блокирует взаимодействие PVRIG и PVRL2, отдельно или в комбинации с другими антителами (например, анти-TIGIT, анти-DNAM1). PD1 использовали в качестве эталонной иммунной контрольной точки для исследований указанного нокдауна (киРНК).

Материалы и способы:

TIL: инфильтрирующие опухоли лимфоциты (TIL) от трех пациентов с меланомой были использованы (1) TIL-412-HLA-A2-Mart1, (2) TIL-F4-HLA-A2-gp100, и (3) TIL-209-HLA-A2-gp100. TIL оттаивали в полной среде IMDM (BI, 01-058-1A), дополненной 10% человеческой сыворотки (Sigma, H3667) + 1% глутамакса (Life technologies, 35050-038) + 1% Na-пирувата (Biological Industries, 03-042-1B) + 1% заме-

нимых аминокислот (Biological Industries, 01-340-1B) + 1% Pen-Strep (пенициллин/стрептомицин) (Biological Industries, 03-031-1B) + 300 ед/мл rhIL2 (Biolegend, 509129).

Линии опухолевых клеток: клетки меланомы человека Mel-624 экспрессируют антигены MART-1 и gp-100 при гаплотипе MHC-I HLA-A2. Клетки культивировали в полной среде DMEM с добавлением 10%, 25 мМ буфера HEPES, 1%, и 1% Pen-Strep.

Нокдаун в TIL: Нокдаун (KD) PVRIG человека и PD1 человека в TIL проводили с использованием 100 пмоль Dharmacon ON-TARGETplus киРНК PVRIG человека -SMARTpool (L-032703-02) или киРНК PD1 человека - SMARTpool (L-004435)) или ненацеливающей киРНК (D-001810-01-05). КиРНК была введена методом электропорации в TIL (AMAXA, программа X-005). Электропорацию проводили на покоящихся TIL, культивируемых в полной IMDM, дополненной ИЛ-2 после 24-часового оттаивания. После электропорации TIL пересеивали в 96-луночный планшет TC для восстановления в течение 24 ч. Через 24 ч клетки собирали и окрашивали красителем для оценки жизнеспособности (BD Horizon, кат. № 562247, BD biosciences), промывали PBS и окрашивали антителом против PVRIG человек -CPA.7.021 (CPA.7.021 IgG2 A647, 7,5 мкг/мл) или антителом против PD-1 человека (Biolegend, № 329910 AF647, 5 мкг/мл) при комнатной температуре в течение 30 мин. Используемый изотипический контроль представляет собой синагис (IgG2 A647, 7,5 мкг/мл) и IgG1 мыши (Biolegend № 400130 A647, 5 мкг/мл) соответственно. Все образцы измеряли на анализаторе MACSQuant (Miltenyi) и данные анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo (v10.0.8).

Совместное культивирование TIL с клетками меланомы 624:

TIL, электропорированные киРНК, собирали и высевали в 96-луночный TC-планшет 5×10^4 /лунку. Клетки Мел-624 также собирали и высевали в соотношениях 1:1/1:3 Е: Т в совместной культуре. Планшет инкубировали в течение ночи (18 ч) при 37°C, 5% CO₂.

Для оценки влияния анти-PVRIG антител (CPA.7.021), анти-TIGIT (клон 10A7; от Genentech, заявка на патент США № US 2009/0258013) и анти-DNAM1 (клон DX11, впервые описанный в Shibuya et al Immunity Vol. 4, Issue 6, 1 June 1996, Pages 573-581; BD Biosciences; мышинный клон против DNAM-1 человека DX11, кат. № 559787) на специфичную для меланомы активность TIL, TIL (1×10^5 клеток/лунку) предварительно инкубировали с тестируемыми антителами или соответствующими изотипическими контролями в монотерапии (10 мкг/мл) или в комбинированной терапии (конечная концентрация 10 мкг/мл для каждого) перед добавлением клеток-мишеней меланомы 624 при соотношении 1:1 эффектор: мишень. Планшет инкубировали в течение ночи (18 ч) при 37°C, 5% CO₂.

Оценка активации TIL: через 16 ч после совместного культивирования клетки окрашивали красителем на жизнеспособность (BD Horizon, кат. № 562247, BD biosciences), промывали PBS и подвергали воздействию Fc-блокирующего раствора (кат. № 309804, Biolegend) с последующим поверхностным окрашиванием анти-CD8a (кат. № 301048, Biolegend) и анти-CD137 (кат. № 309804, Biolegend) при 4°C в течение 30 мин. Все образцы выполняли на анализаторе MACSQuant (Miltenyi), и данные анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo (v10.0.8). Супернатанты культуры собирали и анализировали на секрецию цитокинов при помощи набора CBA (кат. № 560484, BD).

Результаты

Нокдаун PVRIG в TIL: TIL MART-1 и TIL F4 культивировали в течение 24 ч с ИЛ-2. 100 пмоль ON-TARGETplus киРНК PVRIG человека - SMART pool (L-032703-02) или киРНК PD1 человека - SMARTpool (L-004435), или ненацеливающая киРНК (D-001810-01-05) были электропорированы в TIL (AMAXA, программа X-005). Обнаружение PVRIG или PD-1 проводили через 24 ч после электропорации (и до совместного культивирования). Клетки окрашивали красителем на жизнеспособность с последующей инкубацией в течение 30 мин при комнатной температуре с анти-PVRIG или анти-PD-1. Процент популяции KD указан на фиг. 82 USSN 15/048967, включенной в данный документ посредством ссылки.

Функциональный анализ с использованием TIL с нокдауном: TIL человек, культивированные в течение 24 ч с ИЛ-2, были электропорированы киРНК, кодирующей PVRIG или PD-1 человека, или скремблированную последовательность в качестве контроля. TIL были протестированы на экспрессию PVRIG и PD-1 через 24 ч после электропорации. Наблюдали ~ 80% нокдаун PVRIG и ~50% нокдаун PD-1 по сравнению с TIL, подвергшимся электропорации скремблированной последовательностью, как изображено на фиг. 82 USSN 15/048967, включенном в данный документ посредством ссылки.

KD TIL культивировали с клетками Mel-624 в 1:1 или 1:3 Е:Т в течение 18 ч и окрашивали для экспрессии CD137. Повышенные уровни активационного маркера CD137 были показаны в TIL MART-1, подвергшихся электропорации киРНК PVRIG, аналогично TIL, которые подвергали электропорации киРНК PD-1, по сравнению с контрольной скремблированной киРНК (как изображено на фиг. 83A USSN 15/048967, включенной в данный документ посредством ссылки). Супернатант совместной культуры собирали и тестировали на присутствие секретируемых цитокинов. TIL, которые подвергали электропорации с киРНК PVRIG, демонстрируют значительное увеличение уровней ИФН-γ и ФНО по сравнению с контрольной SCR киРНК (SCR-скремблированная). Аналогичный эффект был продемонстрирован в TIL, которые подвергали электропорации с киРНК PD-1 (как изображено на фиг. 83B-C USSN 15/048967, включенной в данный документ посредством ссылки).

Та же тенденция увеличения уровней активации наблюдалась в TIL F4. Совместное культивирование TIL F4, подвергшихся электропорации киРНК PVRIG, с Mel-624 в 1:3 Е:Т приводила к повышенным уровням поверхностной экспрессии CD137, а также к увеличению секреции ИФН- γ в супернатанте совместной культуры, как изображено на фиг. 84А и 84В USSN 15/048967, включенной в данный документ посредством ссылки.

Аналогичные тенденции наблюдались в TIL, которые подвергали электропорации киРНК PD-1.

Функциональный анализ с использованием блокирующих Ат:

Монотерапия *in vitro* и комбинированная терапия анти-PVRIG и анти-TIGIT: 209 TIL культивировали с клетками Mel-624 в 1: 1 Е: Т в течение 18 ч. Супернатант совместной культуры собирали и тестировали на присутствие секретируемых цитокинов. Лечение анти-TIGIT не влияло на уровни секреции ИФН- γ или ФНО. Тем не менее, увеличение уровней ИФН- γ и ФНО наблюдалось, когда анти-TIGIT и анти-PVRIG были добавлены к совместной культуре в комбинации (фиг. 8А-В).

Монотерапия *in vitro* и комбинированная терапия анти-PVRIG и анти-TIGIT: 209 TIL культивировали с клетками Mel-624 в 1: 1 Е: Т в течение 18 ч. TIL окрашивали на поверхностную экспрессию активационного маркера CD137 и демонстрировали снижение уровня экспрессии при лечении анти-DNAM-1. Супернатант совместной культуры собирали и тестировали на присутствие секретируемых цитокинов. Лечение анти-DNAM-1 опосредовало тенденцию к увеличению секретируемых цитокинов ИФН- γ и ФНО. Лечение анти-DNAM-1 и анти-PVRIG в комбинации частично изменяло влияние на экспрессию CD137 (фиг. 9С) и усиливало влияние на секрецию цитокинов ИФН- γ и ФНО (фиг. 9А-В). MART-1 TIL культивировали с клетками Mel-624 в 1: 1 Е: Т в течение 18 ч. Супернатант совместной культуры собирали и тестировали на присутствие секретируемых цитокинов. Лечение анти-DNAM-1 уменьшало поверхностную экспрессию CD137 на TIL, а также секретируемых цитокинов ИФН- γ и ФНО. Лечение анти-DNAM-1 и анти-PVRIG в комбинации частично изменило эти эффекты (фиг. 9D-F).

Сущность изобретения и выводы: PD1 KD улучшает активность TIL, как было измерено по ИФН- γ и секреции в F4 и MART-1 TIL. Увеличение (~20%) секреции ИФН- γ и ФНО наблюдалось при нокдауне PVRIG в MART-1 TIL по сравнению с контрольной киРНК. Такая же тенденция наблюдалась для экспрессии CD137 при совместном культивировании с клетками меланомы 624 HaF4 TIL.

Лечение анти-TIGIT не влияло на уровни секреции ИФН- γ или ФНО из TIL, совместно культивированных с 624 Mel, однако наблюдалось увеличение уровней ИФН- γ и ФНО, когда анти-TIGIT и анти-PVRIG (CPA.7.021) добавляли к совместной культуре в комбинации.

Лечение анти-DNAM-1 снижало активацию TIL-MART-1, проявляющуюся снижением секреции CD137 и цитокинов, и анти-PVRIG (CPA.7.021) могли частично отменить этот эффект при комбинированной терапии с помощью Ат к DNAM-1. В TIL 209 уровни секреции ИФН- γ и ФНО были слегка повышенными (~ 10%) с анти-DNAM-1, а увеличение уровней ИФН- γ и ФНО (~ 40 и 30% соответственно) наблюдалось, когда анти-DNAM1 и анти-PVRIG (CPA.7.021) добавляли к совместной культуре в комбинации. В совокупности наши результаты продемонстрировали, что PVRIG является новым коингибирующим рецептором для PVRL2.

2. Пример 2 (2):

Было оценено влияние дополнительных анти-PVRIG антител (CHA.7.518.1.H4 (S241P), CHA.7.524, CHA.7.530, CHA.7.538), которые продемонстрировали блокирование взаимодействия PVRIG и PVRL2, отдельно или в комбинации с другими антителами (например, анти-TIGIT, PD1), на активность TIL-209, TIL-412 и TIL-463-F4 при совместном культивировании с линией клеток меланомы 624.

Функциональными антителами, используемыми в этом анализе, были анти-hPVRIG гибридомные Ат (остов mIgG1) - CHA7.518.1.H4 (S241P); CHA.7.524; CHA.7.530; CHA.7.538 (лот M1 № 30816); анти-hTIGIT (остов mIgG1) - клон 10A7 (Genescript), анти-TIGIT клон MBSA43 (e-biosciences) и mIgG1 (кат. № 400166, клон MOPC-21, Biolegend)

Совместная культура TIL и 624 Mel: TIL оттаивали и культивировали, как описано в 2.1 24 ч до совместного культивирования. Протестированные Ат добавляли в монотерапию (10 мкг/мл) или в комбинации с анти-TIGIT (20 мкг/мл) к посеянным TIL и инкубировали (всего 100 мкл) в течение 1 ч при 37°C, 5% CO₂. Клетки Mel-624 собирали и высевали в соотношении 1:3 эффектор: мишень в совместной культуре с TIL. Планшет инкубировали в течение ночи (18 ч) при 37°C, 5% CO₂.

Оценка функциональной способности TIL: активность Т-клеток оценивали на основании определения ИФН- γ в супернатантах совместной культуры. Супернатанты культуры собирали и тестировали на цитокины с помощью набора CBA (кат. № 560484, BD) или набора MAGPIX ИФН- γ /ФНО- α человека. Был рассчитан непарный двусторонний t-критерий Стьюдента. P < 0,05 считалось как статистически значимое.

Результаты

Функциональный анализ с использованием TIL и клеток меланомы в присутствии анти-PVRIG гибридомных Ат: человеческие TIL, культивированные в течение 24 ч с ИЛ-2, были совместно культивированы с клетками Mel-624 в 1: 3 Е: Т в течение 18 ч и были протестированы на секрецию цитокинов. На фиг. 31 описан репрезентативный эксперимент из 5-6 выполненных. TIL были совместно культивирова-

ны с клетками меланомы 624 в присутствии анти-TIGIT или анти-PVRIG Ат (синий), или в комбинации анти-TIGIT и анти-PVRIG (зеленый) и тестировались на секрецию ИФН- γ /ФНО. В этом эксперименте все 4 анти-PVRIG Ат монотерапии увеличивали (20-30%) секрецию ИФН- γ в 2 из 3 тестируемых TIL (TIL-209 и TIL463-F4), в то время как в комбинации с анти-TIGIT все анти-PVRIG Ат CHA.7.518.1.H4 (S241P), CHA.7.530, CHA.7.538 увеличивали секрецию ИФН- γ по сравнению с лечением только анти-TIGIT.

Эффект Ат CHA.7.518.1.H4 (S241P) был статистически значимым в экспериментах на TIL 463-F4-gp100 в 5 экспериментах как моно, так и в комбинации с анти-TIGIT (фиг. 9E, G). Эффект комбинированной терапии анти-PVRIG Ат CHA.7.518.1.H4 (S241P) также был статистически значимым в TIL 209 (фиг. 9C). Эффект комбинированной терапии анти-PVRIG Ат CHA.7.538 был статистически значимым в TIL 463-F4-gp100 (фиг. 9F).

Резюме и выводы:

В экспериментальных системах, описанных в данном документе, мы наблюдали эффект анти-PVRIG на TIL в ответ на клетки-мишени меланомы, как видно из изменений в секреции ИФН. Протестированные анти-PVRIG гибридные Ат опосредовали увеличение секреции ИФН- γ по сравнению с соответствующим изотипическим контролем. Ат CHA.7.518.1.H4 (S241P), по-видимому, имеет преимущество в опосредовании увеличения секреции ИФН- γ в качестве монотерапии и по сравнению с другими тестируемыми aPVRIG Ат, однако величина этих эффектов варьирует между разными TIL. Этот эффект усиливается в комбинации с лечением анти-TIGIT.

3. Пример 2(3):

Целью является оценка функциональной активности антител против PVRIG человека (CHA.7.518.1.H4 (S241P), CHA.7.544 или CHA.7.538) на активность человеческого TIL при совместном культивировании с клетками CHO-S, которым вводили пептид, стабильно коэкспрессирующими HLA-A2, b2-микроглобулин (B2M) и PVRL2.

Использовали TIL из резецированных метастазов трех пациентов с меланомой: TIL-412-HLA-A2-Mart1 (26-35) специфичный, TIL-463-F4-HLA-A2-gp100 (209-217) специфичный, TIL-463-F5-HLA-A2-gp100 (209-217) специфичный и TIL-209-HLA-A2-gp100 (209-217) специфичный.

TIL оттаивали в полной среде IMDM с добавлением 10% человеческой сыворотки + 1% глутамакса +1% Na-пирувата +1% заменимых аминокислот +1% Pen-Strep + 300 ед/мл rhIL2 (Biolegend, 589106).

Клетки CHO-S (клетки-мишени) стабильно трансдуцировали лентивирусом, экспрессирующим HLA-A2/B2M, (лентивирусный вектор кат. № CD515B-1-SBI, system biosciences) и выращивали в условиях селекции гигромицином В 600 мкг/мл в среде CD CHO (кат. № 10743-011), дополненный 8 mM GlutaMax 1% и 1% Pen/Strep. Клетки, экспрессирующие HLA-A2/B2M, затем клонировали путем предельного разведения. Клон 3E8 с высокой экспрессией HLA-A2 и B2M затем трансдуцировали лентивирусом, экспрессирующим PVRL2 человека (лентивирусный вектор, кат. № CD510B-1-SBI, system biosciences) и выращивали в условиях селекции пуромицином 6 мкг/мл.

В экспериментальной системе, описанной в данном документе (см. фиг. 35), gp100 или MART-1-реактивные TIL, которые эндогенно экспрессируют TIGIT, DNAM-1 и PVRIG, (фиг. 37) были совместно культивированы с клетками CHO-S HLA-A2/B2M/PVRL2, которым вводили пептид.

Функциональные антитела, используемые в этом анализе, были антителами к PVRIG человека; Ат 461 (Aldeveron) - упоминается как 544 в этом примере, химерное Ат против PVRIG человека (остов hlgG4) - CHA.7.538; CHA.7.518 (в данном примере упоминаются как c538 и c518, что означает, что вариабельные области тяжелой и легкой цепей из 7.538 и 7.518 были слиты с константными областями человеческого IgG4 против TIGIT человека (остов mlgG1), клона MBSA43 (e-biosciences), mlgG1 (biolegend) и hlgG4 (biolegend).

TIL оттаивали и культивировали, как описано в данном документе, в течение 24 ч до совместного культивирования с клетками-мишенями. Протестированные антитела добавляли в монотерапию (10 мкг/мл) или в комбинации с анти-TIGIT (всего 20 мкг/мл) к посеянным TIL и инкубировали (всего 100 мкл) в течение 30 мин при 37°C, 5% CO₂. Клетки CHO-S собирали и вводили 0,1 или 0,5 мкг/мл gp-100 (gp100209-217) или 20 мкг/мл пептидов MART-126-35 в течение 1 ч при 37°C в среде с уменьшенным содержанием сыворотки Opti-MEM™. После трех промывок средами с уменьшенным содержанием сыворотки Opti-MEM™, клетки-мишени, в которые вводили пептид, в течение ночи (18 часов) совместно культивировали с TIL в соотношении эффектор: мишень 1: 3 (33k: 100k).

Оценка функциональной способности TIL: влияние анти-PVRIG антител (10 мкг/мл) в качестве монотерапии или комбинированной терапии анти-TIGIT на активность TIL оценивали с использованием измерения секреции цитокинов из супернатантов совместной культуры, которые культивировали в течение ночи, с использованием набора Combined Bead Array (CBA) (кат. № 560484, BD). Все образцы были прочитаны на анализаторе MACSQuant (Miltenyi), и данные анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo (v10.0.8).

Дозозависимый ответ анти-PVRIG антител: эффект дозозависимого ответа анти-PVRIG антител c518, c538 (или изотипического контроля hlgG4) был протестирован в описанном анализе с концентра-

циями антител 30, 10, 3, 1, 0,3, 0,1 и 0,03 мкг/мл. Был рассчитан непарный двусторонний t-критерий Стьюдента. $P < 0,05$ считалось как статистически значимое.

Результаты

Влияние анти-PVRIG антител на активность TIL при совместном культивировании с клетками CHO-S HLA-A2/B2M, экспрессирующими PVRL2: влияние трех анти-PVRIG антител (544, c538 и c518) на активность четырех различных TIL (412, 463), 462 и 209) из двух разных экспериментов обобщены на фиг. 37. Ат служил в качестве контрольного неблокирующего Ат. Подробные результаты экспериментов представлены на фиг. 39. Обработка антителами 544, c538 и c518 увеличивала уровни секреции ИФН из TIL (в среднем на 6, 28 и 23% соответственно) по сравнению с обработкой изотипическим антителом. Повышенная секреция ИФН была обнаружена в TIL, обработанных c538 или c518, по сравнению с 544, неблокирующим контролем. Не было обнаружено существенных различий между обработками с c538 до c518 Ат. Обработка анти-TIGIT увеличивала секрецию ИФН из TIL (в среднем 49%) по сравнению с изотипом. Комбинированная обработка c518 и c538 с анти-TIGIT индуцировала аддитивный эффект в секреции ИФН из TIL, но комбинированный эффект не был статистически значимым по сравнению с монотерапией TIGIT.

Эффект дозы анти-PVRIG антител на функциональную способность TIL: эффект добавления анти-PVRIG антитела (c538 и c518) в дозозависимом ответе на активность TIL F4 и 209 был оценен (фиг. 80). ЭК50 антител c518 и c538 находится в одноразрядном числе нМ по сравнению с изотипическим контролем, как измерено по влиянию секреции ФНО- α из TIL.

Резюме и выводы: в экспериментальной системе, описанной в данном документе, мы наблюдали эффект анти-PVRIG антител на активность TIL в ответ на совместное культивирование с клетками-мишенями CHO-S, которым вводили пептид, HLA-A2/B2M, экспрессирующими PVRL2. Анти-PVRIG антитела, которые были протестированы, опосредовали усиленную секрецию ИФН и ФНО из TIL по сравнению с соответствующим изотипическим контролем. Антитела c518 и c538 имеют статистически значимое преимущество ($p=0,0063$ и $p=0,0034$, соответственно) на активность TIL, что проявляется в секреции ИФН, по сравнению с 544, которое является неблокирующим антителом PVRIG (на основе конкурентного эксперимента, проведенного на клетках, экспрессирующих PVRIG). Оба антитела c518 и c538 имели аддитивный эффект с анти-TIGIT антителом (статистически значимым).

4. Пример 2(4)

Целью данного примера была оценка функциональной способности PVRIG в TIL человеческого происхождения, измеряемую по секреции цитокинов, при совместном культивировании с клетками-мишенями меланомы. Было оценено влияние анти-PVRIG антител (CHA.7.518.1.H4 (S241P), CHA.7.524, CHA.7.530, CHA.7.538), которые продемонстрировали блокирование взаимодействия PVRIG и PVRL2 отдельно или в комбинации с другими антителами (например, анти-TIGIT, PD1).

Очищенные CD3⁺ Т-лимфоциты получали с использованием набора смеси для обогащения Т-клеток человека (Stem cell technologies) на образцах крови для получения лейкоцитарной пленки. Клетки оттаивали и метили CFSE (зонды Molecular), чтобы отслеживать пролиферацию в совместной культуре.

Клетки CHO-S-OKT3: клетки CHO-S трансдуцировали CD5L-OKT3-scFv-CD14 в CD710B-1 (SBI, кат. № CS965A-1, партия № 151014-005, $1,40 \times 10^8$ ifus/мл). Клетки культивировали в присутствии CD CHO (Gibco, life technologies, кат. № 10743-011) с добавлением 8 мМ глутамакса и 6 мкг/мл пуромицина. Поверхностные уровни OKT3 оценивали с помощью проточной цитометрии с использованием PE-козьего антимышинного IgG F(ab)'2 при разведении 1: 200 (Jackson ImmunoResearch, кат. № 115-116-146). Затем клетки CHO-S-OKT3 временно трансфицировали человеческим PVRL2 (дельта-изоформой) или пустым вектором, используя систему электропорации Амаха (Lonza, Уолкерсвилл, штат Мэриленд, США) в соответствии с инструкциями производителя. Использовали 5 мкг плазмиды pcDNA3.1 (пустой вектор или hPVRL2) в 2×10^6 клетках в растворе для электропорации Ingenio™ (Minis, кат. № MC-MIR-50115) и импульс-программу U-024. Экспрессию PVRL2 на трансфицированных клетках CHOS-S-OKT3 оценивали с помощью проточной цитометрии с использованием анти-PVRL2 Ат (кат. № 337412, Biolegend).

Функциональными антителами, используемыми в этом анализе, были анти-hPVRIG гибридные Ат (остов mIgG1) - CHA7.518.1.H4 (S241P); CHA.7.524; CHA.7.530; CHA.7.538, анти-TIGIT клон MBSA43 (e-biosciences) и mIgG1 (кат. № 400166, клон MOPC-21, Biolegend).

Совместное культивирование клеток CD3 и клеток CHO-OKT3: CD3⁺ Т-клетки оттаивали и сразу метили CFSE. Параллельно клетки CHO-S-OKT3-PVRL2 собирали и обрабатывали митомицином-С в течение 1 часа при 37 °C, промывали и добавляли к совместной культуре с Т-клетками в 1: 5 Е:Т (1×10^5 Т-клеток и 2×10^4 CHO-OKT3-PVRL2 или пустой образец). Ат добавляли в монотерапии (10 мкг/мл) или в комбинации с анти-TIGIT (10 мкг/мл), а планшеты для совместного культивирования инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 5 суток. Через 5 суток клетки собирали и пролиферацию Т-клеток анализировали с помощью FACS с гейтированием по субпопуляциям CD4 и CD8.

Влияние анти-PVRIG антител в анализе совместной культуры CHOS-OKT3: Т-клетки, меченные CFSE, стимулировали клетками-стимуляторами (клетки CHO, экспрессирующие мембраносвязанные

фрагменты анти-CD3 мкАт). Клетки-стимуляторы CHOS, экспрессирующие человеческие PVRL2 и контрольные клетки-стимуляторы (пустой вектор), обработанные митомицином С (50 мкг/мл в течение 1 ч) перед совместным культивированием с мечеными CFSE человеческими Т-клетками в соотношении 1:5. Через 5 суток при 37°C и 5,0% CO₂ эффект анти-PVRIG антител (10 мкг/мл) на пролиферацию Т-клеток (разведение CFSE) и секрецию цитокинов (наборы ИФА или TH1/2/17 CBA) в супернатантах культуры был оценены. Все образцы были прочитаны на анализаторе MACSQuant (Miltenyi), и данные анализировали с использованием программного обеспечения Flow Jo (v 10.0.8). Супернатанты культуры собирали и анализировали на секрецию цитокинов при помощи набора CBA (кат. № 560484, BD).

Результаты

Влияние анти-PVRIG антител на сверхэкспрессию PVRL2 в анализе CHOS-ОКТ3: клетки CHOS-ОКТ3, сверхэкспрессирующие PVRL2, или контрольные клетки (пустые векторы) были совместно культивированы с CD3+ клетками, а эффект анти-PVRIG антител в виде монотерапии или в комбинации с анти-TIGIT по пролиферации Т-клеток и секреции цитокинов (фиг. 40). Через 5 суток клетки собирали и анализировали на разведение CFSE. Параллельно супернатант совместной культуры собирали и тестировали на секрецию цитокинов. на фиг. 41 показано влияние анти-PVRIG Ат у отвечающего против неотвечающего донора. Оценивали влияние различных анти-PVRIG Ат на пролиферацию Т-клеток в виде монотерапии в комбинации с анти-TIGIT. Хотя некоторые анти-PVRIG Ат усиливают пролиферацию Т-клеток, в этой системе не наблюдается аддитивного эффекта с анти-TIGIT антителом (фиг. 42). Эти эффекты не наблюдались при тестировании Ат при совместном культивировании CD3+ клеток с контрольными (трансфицированные пустым вектором) клетками CHO-S (данные не показаны).

Всего было протестировано 10 доноров, и 5 из 10 доноров ответили на анти-PVRIG Ат. Терапия Ат СНА.7.518.1.H4(S241P) последовательно приводила к усилению секреции ИФН-γ в пределах 20-50% у 5 отвечающих доноров, прошедших тестирование, в то время как лечение другими Ат не продемонстрировало четкой тенденции (фиг. 43). Подобные эффекты наблюдались при пролиферации CD8+ клеток. Эффект терапией Ат приведен на фиг. 44.

С. Пример 3: Влияние анти-PVRIG антитела на функции TIL, специфических к меланоме человека, в комбинации с анти-TIGIT и анти-PD1 антителами

1. Пример 3(1):

Материалы и способы

TIL: инфильтрирующие опухоли лимфоциты (TIL) от трех пациентов с меланомой были использованы (1) TIL-412-HLA-A2-Mart1 специфический, (2) TIL-F4-HLA-A2-gp100 специфический, и (3) TIL-209-HLA-A2-gp100 специфический.

TIL оттаивали в полной среде IMDM (BI, 01-058-1A), дополненной 10% человеческой сыворотки (Sigma, H3667) + 1% глутамакса (Life technologies, 35050-038) + 1% Na-пирувата (Biological Industries, 03-042-1B) + 1% заменимых аминокислот (Biological Industries, 01-340-1B) + 1% Pen-Strep (пенициллин/стрептомицин) (Biological Industries, 03-031-1B) + 300 ед/мл rhIL2 (Biolegend, 509129).

Линии опухолевых клеток: клетки меланомы человека Mel-624 экспрессируют антигены MART-1 и gp-100 при гаплотипе MHC-I HLA-A2. Клетки культивировали в полной среде DMEM (Biological Industries, 01-055-1A), дополненной 10% FBS (BI, 04-127-1 A), 25 mM буфера HEPES (BI, 03-025-1B), 1% глутамакса (Life Technologies, 35050-038) и 1% Pen-Strep (Biological Industries, 03-031-1B).

Совместная культура TIL с клетками меланомы 624 в присутствии анти-PVRIG, анти-TIGIT и PD1 блокирующих антител: для оценки влияния анти-PVRIG антител (CPA.7.021), анти-TIGIT (клон 10A7) и анти-PD1 (мкАт 1B8, Merck) на специфичную к меланоме активность TIL, TIL (3×10⁴ клеток/лунку) предварительно инкубировали с тестируемыми антителами или соответствующими изотипическими контролями при монотерапии (10 мкг/мл) или в комбинированной терапии (конечная 10 мкг/мл для каждого) до добавления клеток-мишеней меланомы 624 в соотношении 1:3 эффектор: мишень. Планшет инкубировали в течение ночи (18 ч) при 37°C, 5% CO₂.

Оценка активации TIL: Супернатанты культуры собирали и анализировали на секрецию цитокинов при помощи набора CBA (кат. № 560484, BD).

Монотерапия in vitro анти-PVRIG и комбинированная терапия с помощью анти-TIGIT и PD1-блокирующих антител: F4 TIL (gp100 sepecific) культивировали с клетками Mel-624 в 1: 3 E: T в течение 18 ч. Супернатант совместной культуры собирали и тестировали на присутствие секретлируемых цитокинов. Терапия анти-TIGIT или анти-PD1 не влияла на уровни секреции ИФН-γ или ФНО. Тем не менее, наблюдалось увеличение уровней ИФН-γ и ФНО, когда анти-TIGIT и анти-PVRIG или анти-PD1 в комбинации были добавлены к совместной культуре в комбинации (фиг. 10A-B).

Терапия анти-PVRIG, анти-TIGIT и PD1 в отдельности не влияла на уровни секреции ИФН-γ или ФНО от совместного культивирования TIL с 624 Mel, однако увеличение уровней ИФН-γ и ФНО наблюдалось, когда анти-TIGIT или анти-PD1 антитела были добавлены в комбинации с анти-PVRIG (CPA.7.021). Представленные данные свидетельствуют о синергетическом эффекте для комбинированной терапии анти-TIGIT или анти-PD1 антител.

2. Пример 3(2):

Опять же, оценивали способность анти-PVRIG антител усилить функцию CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток в комбинации с анти-TIGIT антител в первичном анализе на основе клеток *in vitro*.

CHO-S ОКТ3: анализ CHO-S ОКТ3 использовали для определения того, может ли комбинация гуманизированного антитела к PVRIG, CHA.7.518.1.H4 (S241P) и коммерчески доступного анти-TIGIT антитела, увеличить пролиферацию Т-клеток, и секрецию цитокинов больше, чем терапия одним анти-PVRIG или анти-TIGIT. Клетки-мишени, используемые в анализе совместной культуры, представляли собой клеточную линию яичника китайского хомячка, CHO-S (ATCC), стабильно сверхэкспрессирующую одноцепочечный вариабельный фрагмент антитела к CD3 человека клон ОКТ3 (сокращенно ОКТ3) и PVRL2 человека (сокращенно hPVRL2). Исходные клетки CHO-S ОКТ3 выращивали в бессывороточной среде CD-CHO с добавлением 40 мМ глутамакса, пенициллина/стрептомицина и 6 мкг/мл пуромидина. Клетки CHO-S ОКТ3 hPVRL2 выращивали в бессывороточной среде CD-CHO с добавлением 40 мМ глутамакса, пенициллина/стрептомицина, 6 мкг/мл пуромидина и 600 мкг/мл гигромицина В.

Первичные CD3⁺ и CD8⁺ Т-клетки выделяли из здоровых доноров-людей, используя обогащенную смесь RosentSep™ для CD3⁺ Т-клеток человека (Stemcell Technologies) и микрогранулы CD8⁺ человека (Miltenyi Biotec), соответственно, и замораживали в жидком азоте. В день анализа совместной культуры CD3⁺ или CD8⁺ Т-клетки оттаивали, подсчитывали и метили 1 мкМ CFSE (Life Technologies) в течение 10 мин при 37°C. После данной инкубации Т-клетки промывали и ресуспендировали в полной среде, содержащей RPMI, дополненную 10% инактивированной теплом FBS, (фетальная бычья сыворотка), глутамаксом, пенициллином/стрептомицином, заменимыми аминокислотами, пируватом натрия и 50 мкМ β -меркаптоэтанола. Клетки CHO-S ОКТ3 hPVRL2 собирали из культуры и обрабатывали митомицином С в течение 1 ч при 37°C с периодическим помешиванием. После инкубации клетки-мишени тщательно промывали, подсчитывали и ресуспендировали в полной среде RPMI. Анализ проводили с соотношением 5: 1 Т-клеток (100000) к клеткам-мишеням (20000). Клетки-мишени, Т-клетки и терапии антителами в концентрации 10 мкг/мл добавляли вместе в 96-луночный планшет с U-образным дном (Costar) и инкубировали в течение 3 суток (CD8⁺ Т-клетки) или 5 суток (CD4⁺ Т-клетки) при 37°C. Терапии на основе антител включали только человеческий CHA.7.518.1.H4 (S241P) IgG4, изотипический контроль IgG4 человека в комбинации с мышинным античеловеческим TIGIT (клон MBSA43, eBioscience) и комбинацию CHA.7.518.1.H4 (S241P) и анти-TIGIT (клон MBSA43). Кроме того, была также оценена активность мышинового IgG1 против DNAM-1 человека (клон DX11, BioLegend), изотипический контроль IgG1 мыши (клон MOPC21, BioLegend) и изотипический контроль IgG4 человека.

После 3 или 5-суточного периода инкубации супернатанты совместной культуры анализировали на секретируемые цитокины, включая ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-9, ИЛ-10, ИЛ-13, ИЛ-17A, ИЛ-17F, ИЛ-21, ИЛ-22, ФНО- α и ИФН- γ , с набором для определения цитокинов Th1/Th2/Th17 человека (BD Biosciences) методом цитометрического гранулярного анализа (CBA) или с набором LEGENDplex™ Human Th cytokine kit (BioLegend). Пролиферацию Т-клеток измеряли окрашиванием CD4⁺ или CD8⁺ Т-клеток с помощью набора LIVE/DEAD для фиксирующего водного окрашивания мертвых клеток (ThermoFisher Scientific) анти-CD4 антитела (клон RPA-T4, BioLegend) и анти-CD8 антитела (клон HIT8a, BioLegend) и гейтирование по процентному содержанию живых, CFSE-пролиферирующих CD4⁺ или CD8⁺ Т-клеток. Данные были получены с использованием FACS Canto II (BD Biosciences) и проанализированы с использованием программ FlowJo (Treestar) и Prism (Graphpad).

Результаты: Комбинация CHA.7.518.1.H4 (S241P) и анти-TIGIT антитела увеличивает пролиферацию CD4⁺ Т-клеток по сравнению с терапией одним антителом: способность гуманизированного полученного из гибридомы антитела к PVRIG CHA.7.518.1.H4 (S241P) усиливать пролиферацию первичных CD4⁺ Т-клеток *in vitro* в комбинации с анти-TIGIT антителом оценивали с помощью анализа CHO-S ОКТ3.

На фиг. 33А и В изображен процент пролиферирующих CD4⁺ Т-клеток от двух разных доноров в ответ на совместное культивирование с клетками-мишенями CHO-S ОКТ3 hPVRL2 и обработанных анти-PVRIG и анти-TIGIT антителами или по отдельности, или в комбинации. У данных двух иллюстративных доноров CD3⁺ Т-клеток человека комбинация CHA.7.518.1.H4 (S241P) и анти-TIGIT антитела увеличивает пролиферацию CD4⁺ Т-клеток по сравнению с CHA.7.518.1.H4 (S241P) отдельно, или комбинацией изотипа IgG4 и анти-TIGIT антитела. Анти-DNAM-1 антитело уменьшает пролиферацию CD4⁺ Т-клеток по сравнению с изотипическим контролем IgG1 у обоих доноров.

CHA.7.518.1.H4 (S241P) и анти-TIGIT антитело усиливает пролиферацию CD8⁺ Т-клеток и секрецию ИФН-гамма на фиг. 34А проиллюстрирована способность гуманизированного антитела к PVRIG, CHA.7.518.1.H4 (S241P), увеличивать пролиферацию CD8⁺ Т-клеток в комбинации с анти-TIGIT антителом в анализе CHO-S ОКТ3. У иллюстративного донора CD8⁺ Т-клеток человека комбинация CHA.7.518.1.H4 (S241P) и анти-TIGIT антитела увеличивает пролиферацию CD8⁺ Т-клеток, если Т-клетки совместно культивируются с клетками CHO-S ОКТ3 hPVRL2. Комбинация анти-PVRIG и анти-TIGIT антител увеличивает пролиферацию больше, чем CHA.7.518.1.H4 (S241P), или лечение изотипом hIgG4 плюс анти-TIGIT антителом. На фиг. 34В изображено, что у того же иллюстративного донора

CD8⁺ Т-клеток человека, как описано выше, гуманизированное антитело к PVRIG, CHA.7.518.1.H4 (S241P), в комбинации с анти-TIGIT антителом также усиливает секрецию ИФН- γ в анализе CHO-S ОКТЗ. Комбинация анти-PVRIG и анти-TIGIT антител увеличивает секрецию ИФН- γ больше, чем CHA.7.518.1.H4 (S241P), или лечение изотипом hIgG4 плюс анти-TIGIT. Анти-DNAM-1 антитело уменьшает как пролиферацию CD8⁺ Т-клеток, так и продукцию ИФН- γ по сравнению с изотипическим контрольным антителом IgG1.

Резюме и выводы

Вместе гуманизированное антитело к PVRIG, CHA.7.518.1.H4 (S241P) и анти-TIGIT антитело имели функциональную активность *in vitro* в первичном клеточном анализе CHO-S ОКТЗ. Комбинация CHA.7.518.1.H4 (S241P) и анти-TIGIT антитела приводила к увеличению пролиферации CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, а также секреции ИФН- γ из CD8⁺ Т-клеток по сравнению с терапией или CHA.7.518.1.H4 (S241P), или анти-TIGIT антителом по отдельности. Вместе эти данные демонстрируют, что совместная блокада двух контрольных контрольных точек, PVRIG и TIGIT, увеличивает функцию Т-клеток по сравнению с блокадой одного рецептора.

Следует отметить, что TIGIT не взаимодействует с CD112 (PVRL2, см. фиг. 4Е и 4F Zhu et al, J. Exp. Med. (2016): 1-10); скорее, он взаимодействует с PVR, другим лигандом. PVR экспрессируется в системе CHO/CD112 Zhu et al. Соответственно, наша интерпретация комбинированного эффекта aCD112R (анти-PVRIG антитела) и анти-TIGIT заключается в том, что aCD112R/aPVRIG блокирует взаимодействие человеческого CD112R с человеческим CD112, но анти-TIGIT антитело блокирует взаимодействие человеческого TIGIT с PVR человека или хомяка (на Т-клетках или клетках CHO), Zhu et al. действительно не дают гипотезы про то, почему возникает комбинированный эффект Анти-CD112R/Анти-TIGIT в анализе CHO CD112. То есть, комбинированный эффект возникает не через PVRL2/CD112-лиганд по отдельности.

Д. Пример 4: Картирование эпитопов антител против PVRIG человека на основании перекрестной реактивности с яванским макаком

Обоснование и цели

Цель этого исследования состоит в том, чтобы идентифицировать эпитопы на белке PVRIG, которые определяют перекрестную реактивность антител к PVRIG человека против ортолога яванского макака (супо). Многие из антител против мишени PVRIG человека проявляют различную степень перекрестной реактивности с яванским макаком, несмотря на то что многие из этих антител относятся к одной и той же эпитопной группе. Чтобы пролить свет на молекулярную основу перекрестной реактивности человека/яванского макака (или ее отсутствие), были сконструированы, экспрессированы и очищены несколько мутаций от яванского макака к человеку рекомбинантных белков PVRIG и проверено на связывание с панелью антител против PVRIG человека в ИФА.

Способы

Конструирование вариантов PVRIG яванский макак-к-человеку:

Выравнивание последовательностей человека и ВКД PVRIG демонстрируют 90% идентичность последовательностей и 93% гомологию последовательностей между ортологами человека и яванского макака. Основываясь на характере мутаций (консервативные против неконсервативных) и прогнозирования вторичной структуры (спираль против удлиненной) области мутации, три сайт-направленных мутанта PVRIG яванского макака были созданы для картирования эпитопов, направленного на перекрестную реактивность яванского макака. Эти мутанты включают H61R, P67S и L95R/T97I PVRIG яванского макака. Также были созданы варианты PVRIG дикого типа яванского макака и человека.

Экспрессия и очистка вариантов PVRIG яванского макака, человека и гибрида: все варианты PVRIG были экспрессированы как гибриды ВКД с С-концевой 6XHis меткой в клетках млекопитающих. Белки очищали с помощью аффинной очистки, ионообменной хроматографии и эксклюзионной хроматографии. Очищенные белки диализовали против буфера PBS (pH 7,4) и хранили при 4°C.

ИФА для определения взаимодействия PVRIG-антител: Функциональный ИФА выполняли следующим образом: рекомбинантные белки PVRIG (His-меченные) яванского макака, человека и гибрида яванский макак/человек были адсорбированы на планшете IA в течение ночи при 4°C. Покрытые планшетные лунки дважды промывали PBS и инкубировали с 300 мкл блокирующего буфера (5% обезжиренного сухого молока в PBS pH 7,4) при комнатной температуре (RT) в течение 1 ч. Блокирующий буфер удаляли и планшеты дважды промывали PBS. Варианты PVRIG, связанные с планшетом, инкубировали с мкАт против PVRIG человека (изотип IgG1 человека) в растворе (линейный диапазон от 0,1 мкг/мл до 8 мкг/мл в объеме 50 мкл/лунку) при комнатной температуре в течение 1 ч. Планшеты трижды промывали PBS-T (PBS 7,4, 0,05% Tween20), затем три раза добавляли PBS и 50 мкл/лунку конъюгированного с HRP (пероксидаза хрена) вторичного антитела (специфический к Fc IgG человека, Jackson ImmunoResearch). Это инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч и снова промывали планшеты. Сигналы ИФА были проявлены во всех лунках путем добавления 50 мкл субстрата Sureblue TMB (KPL Inc) и инкубации в течение 5-20 мин. Реакцию с HRP останавливали добавлением 50 мкл 2N H₂SO₄ (VWR), а сигналы поглощения при 450 нм считывали на спектрофотометре SpectraMax (Molecular Devices) или

EnVision (PerkinElmer). Данные экспортировали в Excel (Microsoft) и графики строили в GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.).

Результаты

S67, R95 и 197 в качестве детерминант перекрестной реактивности яванского макака: данные связывания, приведенные на фиг. 18, ясно демонстрируют, что остатки S67, R95 и 197 влияют на перекрестную реактивность яванского макака различными антител. В то время как мутация P67S от яванского макака-к-человеку отрицательно влияет на связывание CPA.7.002 и CPA.7.041, мутация яванского макака-к-человеку L95R/T97I значительно улучшает связывание CPA.7.002, CPA.7.021, CPA.7.028 и CPA.7.041. С другой стороны, мутация яванского макака-к-человеку H61R не влияет на связывание любого из тестируемых антител.

Относительное связывание с вариантами яванского макака-к-человека предлагает три эпитопные группы: относительное связывание антител с вариантами PVRIG яванского макака, человека и гибрида предполагает наличие 3 различных эпитопных групп: группа 1 связывается с остатками R95/I97 (CPA.7.021 и CPA.7.028). Группа 2 связывается с остатками S67 и R95/I97 (CPA.7.002 и CPA.7.041). Группа 3 не связывается с остатками S67 или R95/I97 (CPA.7.024 и CPA.7.050). Эпитопные группы демонстрируют сильную корреляцию со степенью перекрестной реактивности яванского макака этих антител (фиг. 19).

Резюме и выводы: Ограниченное картирование эпитопов, основанное на вариациях яванский макака-к-человеку в БКД PVRIG, идентифицировало остатки S67, R95 и 197 в качестве детерминант перекрестной реактивности яванского макака антител против PVRIG человека. Полное восстановление связывания с L95R/T97I PVRIG яванского макака для антител CPA.7.021 и CPA.7.028 и улучшение связывания CPA.7.002 с этим мутантом настоятельно указывает на то, что остатки R95 и 197 являются критическими эпитопами PVRIG человека для этих антител. Эти данные также указывают на возможный способ прогнозирования перекрестной реактивности ортологов PVRIG приматов, отличных от человека, на основе их первичной аминокислотной последовательности.

Е. Пример 5: Гуманизированные антитела: Анализ связывания и рецептор-лигандного блокирования гуманизированных анти-PVRIG антител гибридного происхождения, CHA.7.518.1.H4(S241P)HCHA.7.538.1.2.H4(S241P)

Этот эксперимент проводили для характеристики связывания CHA.7.518.1.H4 (S241P) и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) с белком PVRIG человека и яванского макака на клеточных линиях и первичных лейкоцитах, чтобы характеризовать способность CHA.7.518.1.H4 (S241P) и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P), чтобы блокировать взаимодействие между PVRIG и PVRL2 и характеризовать размещение эпитопа CHA.7.518.1.H4 (S241P) и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) относительно друг друга, путем оценки конкуренции за связывание с антигеном PVRIG, экспрессируемым на клетках Jurkat.

Анализ FACS сверхэкспрессирующих hPVRIG клеток: для оценки специфичности CHA.7.518.1.H4 (S241P) и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) использовали следующие клеточные линии: исходные НЕК и клетки НЕК, сверхэкспрессирующие клетки. Эти клетки культивировали в DMEM (Gibco) + 10% фетальной телячьей сыворотки (Gibco) + глутамакс (Gibco). Для клеток НЕК, сверхэкспрессирующих hPVRIG, в среду для позитивной селекции добавляли 0,5 мкг/мл пурамицина (Gibco). Для анализа FACS все клеточные линии собирали в фазе логарифмического роста и 50000-100000 клеток на лунку высевали в 96-луночные планшеты. Связывание неконъюгированных CHA.7.518.1.H4 (S241P) и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) (hIgG4) и их соответствующие контрольные образцы оценивали в 8-точечных сериях титрования, начиная с 10 мкг/мл на льду в течение 30 мин - 1 ч. Серии титрования проводили в виде трехкратных серийных разведений. Неконъюгированные первичные антитела были обнаружены с использованием антитела против Fc человека, конъюгированного с Alexa 647 (Jackson Laboratories). Данные были получены с использованием FACS Canto II (BD Biosciences), FACS LSR Fortessa X-20 (BD Biosciences) или IntelliCyt (IntelliCyt Corporation) и проанализированы с использованием программного обеспечения Flow Jo (Treestar) и Prism (Graphpad).

Анализ FACS клеточных линий человека для hPVRIG: для оценки экспрессии и специфичности CHA.7.518.1.H4 (S241P) и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) использовали следующие клеточные линии: Jurkat и HepG2. Клетки Jurkat культивировали в среде RPMI + 10% фетальной телячьей сыворотки, глутамакса, незаменимых аминокислот (Gibco), пирувата натрия (Gibco) и пенициллина/стрептомицина (Gibco). Клетки HepG2 культивировали в DMEM + 10% фетальной телячьей сыворотки + глутамакс. Для анализа FACS все клеточные линии собирали в фазе логарифмического роста и 50000-100000 клеток на лунку высевали в 96-луночные планшеты. Связывание неконъюгированных CHA.7.518.1.H4 (S241P) и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) (hIgG4) и их соответствующие контрольные образцы оценивали в 8-точечной серии титрования, начиная с 10 мкг/мл на льду в течение 30 мин - 1 ч. Неконъюгированные первичные антитела были обнаружены с использованием антитела против Fc человека, конъюгированного с Alexa 647. Серию титрования проводили в виде 3-кратных серийных разведений. Данные были получены с использованием FACS Canto II или IntelliCyt и проанализированы с использованием программного обеспечения FlowJo и Prism.

Анализ FACS PVRIG на размноженных ЦМВ CD8 Т-клетках: ЦМВ-реактивные доноры были приобретены у Cellular Technology Limited (CTL). Поставляемым МКПК вводили в течение 2 ч 10 мкМ пептида ЦМВ 494-503 (NLVPMVATV, Anaspec). Затем МКПК промывали три раза, после чего их высевали в 24-луночные планшеты в течение 9 суток в RPMI + 10% человеческой АВ-сыворотки (Sigma), глутамакса, пенициллина/ стрептомицина и смеси для роста с цитокинами, состоящей из 2 нг/мл ИЛ-2 (R&D systems) и 10 нг/мл ИЛ-7 (R&D systems). Через 9 суток неадгезивные клетки собирали, подвергали фенотипированию для обогащения CD8 Т-клеток и сохраняли в жидком азоте.

Для оценки экспрессии на размноженных ЦМВ Т-клетках CD8 связывание неконъюгированных CHA7.518.1.H4 (S241P) и CHA7.538.1.2.H4 (S241P) (hIgG4) и их соответствующие контрольные образцы оценивали с помощью 8-точечных серий титрования, начиная с 666 нМ на льду в течение 30 мин - 1 ч. Серии титрования проводили в виде 4-кратных серий разбавления. Неконъюгированные первичные антитела были обнаружены с использованием антитела против Fc человека, конъюгированного с Alexa 647. Данные анализировались с использованием программного обеспечения FlowJo и Prism и собирались на BD LSR Fortessa X-20.

Анализ FACS созданных клеток, сверхэкспрессирующих PVRIG яванского макака: для оценки перекрестной реактивности CHA.7.518.1.H4 (S241P) и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) с PVRIG яванского макака (сPVRIG) использовали следующие клеточные линии: исходные exрi и сверхэкспрессирующие сPVRIG exрi клетки. Эти клетки культивировали в DMEM + 10% фетальной телячьей сыворотки + глутамакс. Клетки exрi, транзистентно сверхэкспрессирующие сPVRIG, создавали путем электропорации ДНК сPVRIG в исходные клетки exрi с использованием системы трансфекции Neon. Для анализа FACS клетки exрi сPVRIG использовали в течение 1-3 суток после трансфекции. Исходные клетки exрi были собраны во время фазы логарифмического роста. 50000-100000 клеток на лунку каждого типа высевали в 96-луночные планшеты. Связывание неконъюгированных CHA.7.518.1.H4 (S241P) и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) (hIgG4) и их соответствующих контролей оценивали в 8-точечных сериях титрований, начиная с 10 мкг/мл на льду в течение 30 мин - 1ч. Серии титрования проводили в виде 3-кратных серий разведений. Неконъюгированные первичные антитела были обнаружены с использованием антитела против Fc человека, конъюгированного с Alexa 647. Данные были получены с использованием FACS Canto II или IntelliCyte и проанализированы с использованием программного обеспечения Flow Jo и Prism.

Анализ блокирования рецептор-лиганд на основе клеток: способность CHA7.518.1.H4 (S241P) и CHA7.538.1.2.H4 (S241P) ингибировать взаимодействие PVRIG с его лигандом PVRL2 оценивали в клеточном конкурентном анализе, проводимому в двух ориентациях.

В первой ориентации PVRL2 эндогенно экспрессировали на неманипулированных клетках HEK и измеряли способность CHA.7.518.1.H4 (S241P) и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) блокировать связывание растворимого биотинилированного PVRIG Fc с клетками HEK. Более конкретно, биотинилированный белок PVRIG Fc (33 нМ) и CHA.7.518.1.H4 (S241P) и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) (1,03-198 нМ, hIgG4) последовательно добавляли к 100000 клеткам HEK и инкубировали в течение 1 ч на льду. Затем степень связывания биотинилированного PVRIG Fc была обнаружена путем добавления стрептовидаина Alexa 647 (Jackson Laboratories) в течение 20-30 мин на льду. Клетки промывали дважды в PBS для получения с использованием FACS Canto II. Данные анализировали с использованием Flow Jo, Excel (Microsoft) и Prism.

Во второй ориентации клетки HEK были модифицированы для экспрессии человеческого PVRIG (HEK hPVRIG) и оценивали способность CHA.7.518.1.H4 (S241P) и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) (hIgG4) ингибировать растворимый человеческий PVRL2 Fc. Более конкретно, клетки HEK hPVRIG предварительно инкубировали с CHA.7.518.1.H4 (S241P) и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) (0,66-66 нМ) в течение 30 мин на льду, после чего PVRL2 mFc (человеческий PVRL2 с Fc мыши) добавляли (в течение 1 ч на льду) и измеряли его способность связывать HEK hPVRIG. Степень связывания PVRL2 mFc была обнаружена путем последующего добавления козьего антимишного Fc A647 (Jackson Laboratories) в течение 20-30 мин на льду. Для анализа FACS Canto II клетки дважды промывали в PBS. Данные анализировались с использованием Flow Jo, Excel и Prism.

Пространственный эпитопный анализ на основе клеток: размещение эпитопа для CHA.7.518.1.H4 (S241P) и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) оценивали по их способности конкурировать с другим для связывания с клетками Jurkat. Вкратце, клетки Jurkat собирали в фазе логарифмического роста и окрашивали (г/мл) немеченого CHA.7.518.1.H4 (S241P) и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) в течение 30 мин на льду. Затем клетки Jurkat центрифугировали, промывали и контрастно окрашивали (г/мл) мечеными Alexa 647 CHA.7.518.1.H4 (S241P) и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) в течение 30 мин на льду. Конкуренцию меченых антител за связывание PVRIG с немечеными антителами на клетках Jurkat оценивали по величине сигнала Alexa 647 с помощью проточной цитометрии. Данные были получены с использованием FACS Canto II и проанализированы с использованием Flow Jo, Excel и Prism.

Результаты

CHA7.518.1.H4 (S241P) и CHA7.538.1.2.H4 (S241P) распознают PVRIG на сверхэкспрессирующих клетках, клетках Jurkat и человеческих Т-клетках: способность гибридных гуманизированных антител к PVRIG CHA.7.518.1.H4 (S241P) и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) связываться с PVRIG человека оценивали с

использованием клеток ПЕК, которые сверхэкспрессируют человеческие PVRIG, клеток Jurkat и первичных Т-клеток. на фиг. 20 изображена специфичность как CHA.7.518.1.H4(S241P) (А), так и CHA.7.538.1.2.H4(S241P) (В). Оба антитела специфически связываются с клетками HEK hPVRIG и не связываются с исходными клетками HEK.

Аффинности связывания: как CHA.7.518.1.H4 (S241P), так и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) также демонстрируют связывание с клетками HEK hPVRIG с высокой аффинностью со связанными значениями K_d : 0,29 нМ для CHA.7.518.1. H4 (S241P) и 0,86 нМ для CHA.7.538.1.2 для связывания с клетками HEK hPVRIG.

На фиг. 21 изображена способность CHA.7.518.1.H4(S241P) (А) и CHA.7.538.1.2.H4(S241P) (В) связывать клетки Jurkat, которые эндогенно экспрессируют PVRIG. Оба могут связывать клетки Jurkat с сопоставимой аффинностью к клеткам HEK hPVRIG.

Аффинность этих антител к клеткам Jurkat составляет 0,15 нМ для CHA.7.518.1.H4(S241P) и 0,59 нМ для CHA.7.538.1.2.H4(S241P).

На фиг. 22 изображена способность CHA.7.518.1.H4 (S241P) и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) связывать CD8 Т-клетки, которые были размножены путем воздействия пептида ЦМВ (494-503, NLVPMVATV), и которые эндогенно экспрессируют PVRIG.

CHA.7.518.1.H4 (S241P) и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) обнаруживают PVRIG яванского макака (сPVRIG), экспрессированный в клетках exрi: способность CHA.7.518.1.H4(S241P) и CHA.7.538.1.2.H4(S241P) для связывания с сPVRIG оценивали с использованием клеток exрi, которые сверхэкспрессируют сPVRIG. на фиг. 23 изображена специфичность как CHA.7.518.1.H4(S241P) (А), так и CHA.7.538.1.2.H4(S241P) (В). Оба антитела специфически связываются с клетками exрi сPVRIG и не связываются с исходными клетками exрi. Как CHA.7.518.1.H4 (S241P), так и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) также демонстрируют связывание с клетками exрi сPVRIG с высокой аффинностью со связанными значениями K_d 0,24 нМ для CHA.7.518.1.H4 (S241P) и 0,58 нМ для CHA.7.538.1.2.

Анализы блокирования рецептор-лигандов на основе клеток: способность CHA.7.518.1.H4 (S241P) и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) ингибировать взаимодействие PVRIG с PVRL2 оценивали в двух ориентациях, как указано в разделе протоколов. В первой пермутации как CHA.7.518.1.H4 (S241P), так и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) смогли полностью ингибировать связывание PVRIG Fc с клетками HEK (фиг. 24А). Значения ИК50, связанные с этой блокирующей способностью, составляют 15 нМ для CHA.7.518.1.H4 (S241P) и 16,1 нМ для CHA.7.538.1.2.H4 (S241P). Важно отметить, что не все антитела, полученные на гибридной стадии, способность которых связываться с PVRIG была подтверждена, были способны блокировать связывание PVRIG Fc с клетками HEK. Как изображено на фиг. 24В, клон антитела, обозначенный как CHA.7.544, не способен блокировать связывание PVRIG Fc с клетками HEK.

Во второй пермутации как CHA.7.518.1.H4 (S241P), так и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) также могли полностью ингибировать связывание PVRL2 Fc с клетками HEK hPVRIG (фиг. 25А). Значения ИК50, связанные с этим ингибированием, составляют 1,8 нМ для CHA.7.518.1.H4(S241P) и 2,53 нМ для CHA.7.538.1.2.H4(S241P). Хотя способность CHA.7.518.1.H4 (S241P) и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) были способны полностью ингибировать связывание PVRL2 Fc в этой пермутации, что согласуется с их способностью ингибировать связывание PVRIG Fc в первой пермутации, другие антитела не продемонстрировали такой же тенденции. Более конкретно, еще одно гуманизированное полученное из гибридомы антитело, CHA.7.530.3, которое способно полностью ингибировать связывание PVRIG Fc с клетками HEK (первая пермутация, данные не показаны), не смогло полностью ингибировать связывание PVRL2 Fc с HEK hPVRIG (фиг. 25А). В совокупности эти данные указывают на то, что вторая пермутация в анализе блокирования рецептор-лиганд позволяет отличать активность рецептор-лиганд блокирующих антител с большей чувствительностью по сравнению с первой пермутацией. Важно отметить, что CHA.7.544, как было показано, неспособно блокировать связывание PVRL2 Fc с клетками HEK hPVRIG (фиг. 25В) в соответствии с его неспособностью блокировать связывание PVRIG Fc с клетками HEK.

Пространственный эпитопный анализ на основе клеток: как указано в разделе протоколов, пространственный эпитопный анализ CHA.7.518.1.H4 (S241P) и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) проводился путем оценки их способности конкурировать за связывание PVRIG. На фиг. 26 изображена способность неконъюгированных версий антител ингибировать связывание с конъюгированными с Alexa 647 (A647) версиями тех же антител. Данные на фиг. 26 демонстрируют процентное связывание конъюгированных с A647 антител относительно максимального сигнала, который они дают без конкуренции. На сигнал, полученный от CHA.7.518.1.H4 (S241P) A647 и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) A647, не повлияла предварительная инкубация клеток Jurkat с изотипическим контролем (данные не показаны). Как и ожидалось, сигнал, полученный от CHA.7.518.1.H4 (S241P) A647 и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) A647, был значительно снижен при конкуренции с неконъюгированными версиями самих себя (данные не показаны). Интересно отметить, что при анализе сигнала A647 от CHA.7.518.1.H4(S241P) и CHA.7.538.1.2.H4(S241P) в контексте предварительной инкубации с неконъюгированной версией противоположного антитела также наблюдалось значительное снижение. Это указывает на то, что CHA.7.518.1.H4 (S241P) и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) могут иметь сходное эпитопное пространство на эндогенно экспрессированном PVRIG.

Резюме и выводы: мышинные версии анти-PVRIG антител, обозначенных CHA.7.518 и CHA.7.538,

были успешно гуманизированы в изотип IgG4 человека (CHA.7.518.1.H4 (S241P) и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P)) который сохраняет связывающие свойства в отношении антигена PVRIG человека. Показано, что с использованием модифицированных сверхэкспрессирующих клеток, Jurkat и размноженные ЦМВ первичные CD8 Т-клетки, CHA.7.518.1.H4 (S241P) и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) являются высокоспецифичными для эндогенного человеческого PVRIG и связаны с высокой аффинностью. Кроме того, CHA.7.518.1.H4 (S241P) и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) также проявляли реактивность к антигену PVRIG яванского макака и связывались со сверхэкспрессирующими клетками с высокой аффинностью. Функционально CHA.7.518.1.H4 (S241P) и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) способны ингибировать взаимодействие PVRIG с PVRL2 в анализах на основе FACS. И, наконец, было показано, что CHA.7.518.1.H4 (S241P) и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) потенциально разделяли эпитопное пространство на эндогенном PVRIG человека из-за их способности конкурировать друг с другом за связывание с клетками Jurkat.

Ф. Пример 6: Гуманизированные антитела: функциональный анализ гуманизированных антител

Была подтверждена функциональная активность нескольких гуманизированных антител согласно изобретению.

Анализ CHO-S OKT3: анализ CHO-S OKT3 использовали для определения того, могут ли гуманизированные антитела к PVRIG, CHA.7.518.1.H4 (S241P) и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P), усилить CD4+ и CD8+ Т клеточную пролиферацию и секрецию цитокинов. Клетки-мишени, используемые в анализе совместной культуры, представляли собой клеточную линию яичника китайского хомячка, CHO-S (ATCC), или стабильно сверхэкспрессирующую одноцепочечный вариабельный фрагмент антитела против CD3 человека, клон OKT3 (сокращенно OKT3), или стабильно сверхэкспрессирующую как OKT3, так и PVRL2 человека (сокращенно hPVRL2). Исходные клетки CHO-S OKT3 выращивали в бессывороточной среде CD-CHO (Gibco) с добавлением 40 мМ глутамакса (Gibco), пенициллина/стрептомицина (Gibco) и 6 мкг/мл пурамицина (Gibco). Клетки CHO-S OKT3 hPVRL2 выращивали в той же среде CD-CHO в качестве исходных клеток, но также дополняли 600 мкг/мл гиромидина В (Gibco).

Первичные CD4+ и CD8+ Т-клетки были выделены из здоровых доноров-людей, используя обогащенную смесь RosettSep™ CD4+ Т-клеток человека (Stemcell Technologies) и микрогранулы CD8+ человека (Miltenyi Biotec), соответственно, и замораживали в жидком азоте. В день анализа совместной культуры CD4+ или CD8+ Т-клетки оттаивали, подсчитывали и метили 1 мкМ CFSE (Life Technologies) в течение 10 минут при 37°C. После данной инкубации Т-клетки промывали и ресуспендировали в полной среде, содержащей RPMI (Gibco), дополненной 10% инактивированной теплом FBS, (фетальная бычья сыворотка), глутамаксом, пенициллином/стрептомицином, заменимыми аминокислотами (Gibco), пируватом натрия и 50 мкМ β-меркаптоэтанолом (Gibco). Клетки CHO-S OKT3 и CHO-S OKT3 hPVRL2 собирали из культуры и обрабатывали митомицином С (Sigma-Aldrich) в течение 1 ч при 37°C с периодическим помешиванием. После инкубации клетки-мишени тщательно промывали, подсчитывали и ресуспендировали в полной среде RPMI. Анализ проводили с соотношением 5: 1 Т-клеток (100000) к клеткам-мишеням (20000). Клетки-мишени, Т-клетки и 10 мкг/мл каждого антитела терапии добавляли вместе в 96-луночный планшет с U-образным дном (Costar) и инкубировали в течение 3 суток (CD8+ Т-клетки) или 5 суток (CD4+ Т-клетки) при 37°C. Терапия антителами к PVRIG включала CHA.7.518.1.H4(S241P) IgG4 человека, CHA.7.538.1.2.H4(S241P) IgG4 человека, CHA.7.530.3 IgG4 человека (частично рецептор/лиганд-блокирующее антитело) и CHA.7.544 IgG1 мыши (неблокирующее рецептор/лиганд антитело). В дополнение к антителам к PVRIG также оценивали активность мышиного IgG1 против DNAM-1 человека (клон DX11, BioLegend), изотипического контроля IgG1 мыши (клон MOPC21, BioLegend) и изотипического контроля IgG4 человека. Для титрования дозы антител использовали 3-кратные разведения от 66 нМ до 0,264 нМ антител к PVRIG и использовали соответствующее изотипическое контрольное антитело.

После 3 или 5-суточного периода инкубации супернатанты совместной культуры анализировали на секретируемые цитокины, включая ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-9, ИЛ-10, ИЛ-13, ИЛ-17A, ИЛ-17F, ИЛ-21, ИЛ-22, ФНО-α и ИФН-γ, с набором для определения цитокинов Th1/Th2/Th17 человека (BD Biosciences) методом цитометрического гранулярного анализа (CBA) или с набором LEGENDplex™ Human Th cytokine kit (BioLegend). Пролиферацию Т-клеток измеряли окрашиванием CD4+ или CD8+ Т-клеток с помощью набора LIVE/DEAD для фиксирующего водного окрашивания мертвых клеток (ThermoFisher Scientific) анти-CD4 антитела (клон RPA-T4, BioLegend) и анти-CD8 антитела (клон HIT8a, BioLegend) и гейтирования по процентному содержанию живых, CFSE-пролиферирующих CD4+ или CD8+ Т-клеток. Данные были получены с использованием FACS Canto II (BD Biosciences) и проанализировали с использованием программ FlowJo (Treestar) и Prism (Graphpad).

Результаты

CHA.7.518.1.H4 (S241P) и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) усиливают пролиферацию CD4+ Т-клеток в зависимости от hPVRL2: Способность гуманизированных гибридных антител к PVRIG CHA.7.518.1.H4(S241P) и CHA.7.538.1.2.H4 усиливать пролиферацию первичных CD4+ Т-клеток *in vitro* оценивали с помощью анализа CHO-S OKT3. На фиг. 27А изображен процент пролиферирующих CD4+ Т-клеток от иллюстративного донора в ответ на совместную культуру с клетками-мишенями CHO-S

ОКТ3 hPVRL2 и различными антителами к PVRIG. В этом доноре гуманизированные антитела CHA.7.518.1.H4(S241P) и CHA.7.538.1.2.H4(S241P) увеличивают пролиферацию CD4⁺ Т-клеток по сравнению с изотипическим контролем IgG4 человека (пунктирная линия). Частично блокирующее рецептор/лиганд антитело, IgG4 человека CHA. 7.530.3 только слабо усиливает пролиферацию Т-клеток, в то время как неблокирующее рецептор/лиганд антитело, IgA1 мыши CHA.7.544 мыши не имеет никакого эффекта по сравнению с изотипическими контрольными антителами. Анти-DNAM-1 антитело уменьшает пролиферацию CD4⁺ Т-клеток. на фиг. 27В изображено, что эффекты гуманизированного антитела к PVRIG CHA7.518.1.H4 (S241P) и CHA7.538.1.2.H4(S241P) и анти-DNAM-1 антитела зависят от сверхэкспрессии hPVRL2 на клетках-мишенях. После лечения антителами CHA.7.518.1.H4 (S241P) и CHA.7.538.1.1 наблюдается большее увеличение пролиферации CD4⁺ Т-клеток, когда CD4⁺ Т-клетки совместно культивируются с клетками CHO-S ОКТ3 hPVRL2, по сравнению с совместным культивированием с исходными клетками CHO-S ОКТ3. Аналогично, анти-DNAM-1 антитело только уменьшает пролиферацию CD4⁺ Т-клеток, когда Т-клетки совместно культивируются с hPVRL2-экспрессирующими клетками CHO-S ОКТ3.

CHA.7.518.1.H4 (S241P) и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) усиливают пролиферацию CD8⁺ Т-клеток и секрецию ИФН-гамма: на фиг. 28А-В продемонстрирована способность гуманизированных антител к PVRIG, CHA.7.518.1.H4 (S241P) и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P), увеличивать пролиферацию CD8⁺ Т-клеток в анализе CHO-S ОКТ3. У двух разных доноров CD8⁺ Т-клеток человека антитела, CHA.7.518.1.H4(S241P) и CHA.7.538.1.2.H4(S241P), увеличивают пролиферацию CD8⁺ Т-клеток по сравнению с изотипическим контролем IgG4 человека, когда Т-клетки совместно культивируют с клетками CHO-S ОКТ3 hPVRL2. Однако CHA.7.544 IgG1 мыши имеет небольшое влияние или никакого. Как наблюдалось с CD4⁺ Т-клетками, анти-DNAM-1 антитело уменьшает пролиферацию CD8⁺ Т-клеток. на фиг. 28С изображено, что гуманизированные антитела к PVRIG, CHA7.518.1.H4(S241P) и CHA7.538.1.2.H4(S241P), также усиливают секрецию ИФН-γ в CHO-S ОКТ3. У трех разных доноров CD8⁺ Т-клеток человека антитела, CHA7.518.1.H4(S241P) и CHA7.538.1.2.H4(S241P), увеличивают продукцию ИФН-γ по сравнению с изотипическим контролем IgG4 человека (пунктирная линия). Увеличение ИЛ-10, ИЛ-22 и ФНО-α наблюдалось также после лечения CHA.7.518.1.H4(S241P) и CHA.7.538.1.2.H4(S241P) (данные не показаны).

CHA7.518.1.H4 (S241P) и CHA7.538.1.2.H4 (S241P) последовательно усиливают пролиферацию CD4⁺ Т-клеток у нескольких доноров-людей: Далее, чтобы продемонстрировать, что CHA.7.518.1.H4(S241P) и CHA.7.538.1.2.H4(S241P) могут воспроизводимо усиливать функции Т-клеток, эффекты гуманизированных антител к PVRIG на пролиферацию CD4⁺ Т-клеток были исследованы у 11 разных доноров в анализе CHO-S ОКТ3. На фиг. 29 изображено, что как CHA.7.518.1.H4 (S241P), так и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) последовательно увеличивают пролиферацию CD4⁺ Т-клеток у большинства тестируемых доноров по сравнению с изотипическим контрольным антителом IgG4 человека, если Т-клетки совместно культивировали с клетками CHO-S ОКТ3 hPVRL2. Кроме того, антитело, частично блокирующее рецептор/лиганд, CHA.7.530.3, и антитело, неблокирующее рецептор/лиганд, CHA.7.544, неопосредованно усиливают пролиферацию CD4⁺ Т-клеток у тех же доноров.

CHA7.518.1.H4 (S241P) и CHA7.538.1.2.H4 (S241P) имеют дозозависимый эффект на пролиферацию CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток. Наконец, дозозависимый эффект гуманизированных антител к PVRIG, CHA7.518.1.H4(S241P) и CHA7.538.1.2.H4(S241P), измеряли в анализе CHO-S ОКТ3. Снижение дозы антител CHA.7.518.1.H4 (S241P) и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) снижает процент пролиферации CD4⁺ Т-клеток (фиг. 30А) и CD8⁺ Т-клеток (фиг. 30В), если Т-клетки совместно культивируют с клетками CHO-S ОКТ3 hPVRL2. Этот дозозависимый эффект на пролиферацию Т-клеток не наблюдается с антителом CHA.7.544 или с изотипическим контролем IgG4. Кроме того, не наблюдалось двухфазного эффекта с титрованием дозы, что указывало на отсутствие агонистической активности гуманизированных антител к PVRIG.

Резюме и выводы

Гуманизированные антитела к PVRIG, CHA.7.518.1.H4(S241P) и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P), имели функциональную активность *in vitro* в клеточном анализе CHO-S ОКТ3. CHA7.518.1.H4 (S241P) и CHA7.538.1.2.H4 (S241P) увеличивали пролиферацию CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток дозозависимым образом. CHA.7.518.1.H4 (S241P) и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) также способствовали усилению секреции ИФН-γ в анализе CHO-S ОКТ3. Было показано, что активность антител, CHA.7.518.1.H4 (S241P) и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P), зависит от сверхэкспрессии hPVRL2 на клетках-мишенях. CHA.7.518.1.H4 (S241P) и CHA.7.538.1.2.H4 (S241P) последовательно усиливали активность Т-клеток у нескольких доноров-людей, в то время как неблокирующее антитело CHA.7.544 практически не оказывало никакого эффекта.

Г. Пример 7: Разработка крысиных моноклональных антител для PVRIG мыши

Разработку крысиных моноклональных антител (мкАт) проводили в Aldevron Freiburg (Германия). Антитела против белка PVRIG мыши увеличивали с использованием технологии ДНК-иммунизации. Вектор для иммунизации, экспрессирующий PVRIG мыши, вводили в организм хозяина (крысу). PVRIG

мышь были экспрессированы, и иммунный ответ развивался. Идентификацию положительной антисыворотки и скрининг гибридом анализировали на клетках, которые транзистентно экспрессируют PVRIG мыши.

Создание крысиного пкАт против PVRIG мыши

Разработка крысиных поликлональных антител против белка PVRIG мыши включала клонирование внеклеточного домена PVRIG мыши в вектор для иммунизации, запатентованный Aldevron, и клонирование полноразмерного и внеклеточного домена в скрининговые векторы, запатентованные Aldevron. Различные векторы экспрессии, используемые для иммунизации и для скрининга, были подтверждены при помощи FACS в клетках, которые транзистентно экспрессируют PVRIG мыши. Затем трех крыс иммунизировали вектором для иммунизации. Иммунные сыворотки брали, и разведенные сыворотки тестировали с помощью FACS с использованием клеток, временно трансфицированных векторами для скрининга. Заборы крови из каждой крысы собирали и проводили очистку с использованием протеина-A.

Создание крысиного мкАт против PVRIG мыши

Выполнено слияние крысиных лимфоцитов и селекция с использованием тест-систем Aldevron. Это включало: слияние 20 × 96-луночных планшетов с последующим первоначальным скринингом с помощью клеточного ИФА (сELISA), на транзистентно трансфицированных клетках с ВКД PVRIG мыши (внеклеточный домен) или FL (полноразмерный). 108 положительных клонов (связанных с клетками, экспрессирующими ВКД/FL PVRIG мыши), далее размножали и повторно тестировали; 30 положительных клонов размножали в колбах T-25 и супернатанты тестировали методом клеточного ИФА. 23 гибридных клонов выбирали для дальнейшего субклонирования. Сывороточный супернатант тестировали при помощи сELISA и FACS. Всего было создан 21 клон, и связывание подтверждали на клетках, сверхэкспрессирующих белок PVRIG мыши.

Характеристика Ат

Связывание антител к PVRIG мыши тестовых образцов крови крыс, очищенных пкАт, супернатантов до клонирования и клональных супернатантов, также как очищенных мкАт анализировали с помощью проточной цитометрии с использованием стабильных клеток HEK293, сверхэкспрессирующих PVRIG мыши. Также тестировали связывание антител с клетками D10.G4.1, эндогенно экспрессирующими PVRIG мыши. Специфическая экспрессия на клеточной поверхности PVRIG мыши была подтверждена. Клетки ($1-2 \times 10^5$) окрашивали фиксирующим красителем на жизнеспособность, разведенным 1:1000 в PBS, в течение 10 мин при комнатной температуре, а затем клетки промывали PBS. Затем Ат добавляли к клеткам (разбавляли в буфере для FACS), а затем окрашивали козьим антикрысиным-PE (разведенным 1:100 в буфере для FACS).

Специфичность мкАт была протестирована при помощи киРИК для трансфекции PVRIG клеточной линии D10.G4.1, эндогенно экспрессирующей PVRIG мыши. Снижение клеточной поверхности наблюдалось после нокдауна PVRIG мыши.

МкАт, связывающие NK-клетки, также тестировали при помощи FACS.

Анализ сортировки проводили для демонстрации разнообразия мкАт.

Аффинность очищенных мкАт (Kd) определяли титрованием FACS на стабильных клетках, сверхэкспрессирующих PVRIG мыши, против клеток, трансдуцированных пустым вектором клеток, и на клеточной линии D10.G4.1. Клетки (1×10^5) окрашивали фиксирующим красителем на жизнеспособность, разведенным 1:1000 в PBS, в течение 10 мин при комнатной температуре, а затем клетки промывали PBS. Затем Ат добавляли к клеткам (8 концентраций - сериями разведений 1:3, 10-0,01 мкг/мл, разведенное в буфере для FACS) с последующим окрашиванием с помощью козьего антикрысиного-PE (разведенного 1:100 в буфере FACS).

Характеристика мкАт - сводная таблица

В табл. 7 (столбцы 1-10) приведены данные, полученные для характеристики антител против PVRIG мыши.

Столбец 1 обозначает код ID Ат

В столбце 2 представлено название Ат, предоставленное Aldevron

В столбце 3 представлены данные FACS в виде соотношения СИФ в стабильно сверхэкспрессирующих клетках к клеткам, трансдуцированным пустым вектором, при концентрации 10 мкг/мл мкАт.

В столбце 4 представлена аффинность (нМ) на сверхэкспрессирующих клетках HEK

В столбце 5 представлено связывание с NK-клетками при концентрации 10 мкг/мл мкАт

В столбце 6 представлено соотношение СИФ связывания клеточной линии D10.G4.1 к изотипическому контролю.

В столбце 7 представлена аффинность (нМ) к клеточной линии D10.G4.1

В столбце 8 представлены различные группы в исследовании эпитоп-специфической сортировки

В столбце 9 представлен анализ % рецептор-лигандного блокирования (связывание слитого белка PVRIG-Fc мыши с мышинным PVRL2-сверхэкспрессирующими клетками) и ИК50 (нМ)

В столбце 10 представлен анализ % рецептор-лигандного блокирования (связывание слитого белка PVRL2-Fc мыши с мышинным PVRIG-сверхэкспрессирующими клетками) и ИК50 (нМ)

AB-406 и 0AB-47, которые продемонстрировали блокирующую активность в анализах связывания рецептор-лиганд имеет относительно высокую аффинность, связывается с NK и клетками D10.G4.1.

Эти Ат были выбраны для экспрессии TME и для исследований *in vivo*.

Таблица 7. Характеристика моноклонального Ат против PVRIG мыши

LI MS ID	Название Ат	Соотношение СИФ (НЕК ОХ/ЕV) 10 мкг/мл	Kd (нМ) на ОХ клетках	Экспрессия в NK, MFI _г (Ат/iso)	Экспрессия в D10.G4.1, Соотношение СИФ (Ат/iso)	Kd (нМ) на D10.G4.1 клетках	эпитоп-специфическая сортировка	% R-L блокирования (029-Fc) (IC50)	% R-L блокирования (mPVRL2-Fc) (IK50)
AB - 400	BOJ-1F11-H6	10	0.1393	H/O	13.2	35.68	1	Агонист	Агонист
AB - 401	BOJ-3E2-F4	55.7	2.4	H/O	7.5	H/O	1	Агонист	Несовместимый
AB - 402	BOJ-4F11-H6	4.8	0.08974	H/O	20	H/O	1	Агонист	Агонист
AB - 403	BOJ-4G1-E3	28	57.64	-	2	H/O	4	78% (2.782)	Несовместимый
AB - 404	BOJ-4H8-E3	18.6	0.386833	1.5	6.8	H/O	1	Inert	93-98%
AB - 405	BOJ-5A4-E3	13.5	0.08871	H/O	6.7	4.596	1	Агонист	Агонист
AB - 406	BOJ-5C7-B3	54.5	1.884667	2.2	10	8.577	3	77% (3.679)	97-100%
AB - 407	BOJ-5G4-F4	50	0.334427	2.8	8	1.325	3	95% (3.992)	95-100%
AB - 408	BOJ-8G1-G1	18.9	5.098	1.7	8	H/O	4	90% (3.585)	Агонист
AB - 409	BOJ-9B1-D9	24.8	0.1555	H/O	10	H/O	1	Агонист	Несовместимый
AB - 410	BOJ-11C2-G9	16.6	0.2218	2.4	6.8	H/O	1	Агонист	Несовместимый
AB - 411	BOJ-12E2-F8	36	5.3405	H/O	5.4	H/O	3	94% (4.311)	96-100% (1.189)
AB - 412 *	BOJ-14H2-F4	3.3*	H/O	H/O	2	H/O	2	Агонист	62-67% (23.87)
AB - 413 *	BOJ-15B3-E11	49.3	1.09345	2.1	12	4.693	3	73% (2.836)	95-100% (0.58)
AB - 414	BOJ-15F8-C6	24.8	2.039	1.6	8.5	16.48	3	90%	95-100%
AB - 415	BOJ-16E7-G8	24	17.573	2.2	5	H/O	5	95% (6.727)	93-100% (5.643)
AB - 416	BOJ-17C4-D4	26.3	6.357	1.5	5	H/O	1	Инертный	92-94% (1.963)
AB - 417 *	BOJ-17C7-H5	15	59.16	-	2.5	H/O	4	72% (3.455)	Инертный
AB - 418	BOJ-18C1-C10	64.8	62.98	H/O	4.4	H/O	5	94% (18.18)	100% (8.055)
AB - 419	BOJ-18D2-F5	17	0.3169	1.5	6.3	H/O	1	Агонист	57-64%
AB - 420	BOJ-19D9-C7	33.6	3.172	1.2	20	H/O	4	78% (9.805)	Агонист

Н. Пример 8: Комбинированное тестирование с дополнительными ингибиторами иммунных контрольных точек

Уровень техники

Хотя блокада антителами к путям CTLA4 и PD1 стала эффективным методом лечения рака, большинство пациентов не получают долгосрочный терапевтический эффект, что указывает на необходимость нацеливания на дополнительные контрольные точки иммунной системы. Используя наши уникальные вычислительные алгоритмы для определения новых членов семейства B7/CD28, мы идентифицировали PVRIG, который экспрессируется несколькими субпопуляциями Т- и NK-клеток. В данном документе мы сообщаем о его профиле экспрессии, функциональной характеристике и противоопухолевой активности блокирующих антител, нацеленных на эту молекулу.

Способы

Используя платформу Predictive Discovery, PVRIG идентифицировали как потенциальную новую иммунную контрольную точку, после чего для идентификации когнатного связывающего партнера использовали ретровирусную библиотеку скрининга клеток. Целевые эффекты на модуляцию Т-клеток оценивали с помощью анализа первичных и Т-клеток опухолевого происхождения, используя преимущества подходов сверхэкспрессии мишени, нокдауна и антител-антагонистов. Антитела против человеческого белка подвергали скринингу на их способность повышать активацию Т-клеток *in vitro*, тогда как антитела, нацеленные на ортолог мыши, оценивали *in vivo* на эффекты ингибирования роста опухоли в сингенных моделях.

Результаты

Было обнаружено, что слитый белок PVRIG-Fc связывает PVRL2 со специфичностью связывания, подтвержденной как методом ИФА, так и анализом методом проточной цитометрии. PVRIG продемонстрировал уникальную кинетику экспрессии при активации Т-клеток, с обнаружением мишени на Т-клетках памяти, а также на NK-клетках и $\gamma\delta$ Т-клетках. Было показано, что группа высокоаффинных человеческих антител со способностью блокировать взаимодействие PVRIG с PVRL2, которая при тестировании *in vitro* демонстрирует усиление активации как первичных CD4⁺, так и опухолевых CD8⁺ Т-клеток через PVRL2-зависимый механизм.

Поскольку CHA.7.518.1.H4 (S241P) не является перекрестно-реактивным по отношению к мыши, исследования *in vivo* проводили с суррогатным блокирующим антителом против PVRIG мыши. В комбинации с блокадой анти-PDL-1 антитело против PVRIG мыши ингибирует рост установленных опухолей как в моделях рака прямой кишки CT26, так и в MC38. Комбинированное тестирование с дополнительными ингибиторами иммунной контрольной точки, также как на нокаутных по PVRIG мышей продолжается.

Выводы

Высокоаффинное антагонистическое антитело способно усиливать активацию Т-клеток человека, а суррогатное антитело с аналогичными характеристиками демонстрирует синергизм с PD-L1 *in vivo* в нескольких сингенных моделях. В целом, наши данные демонстрируют целесообразность нацеливания на PVRIG в дополнение к другим контрольным точкам семейства B7 для лечения рака.

1. Пример 9: Экспериментальная проверка концепции *in vivo*: эффективность анти-mPVRIG мкАТ в опухолевой модели CT26

В этом примере описывается эффективность лечения анти-mPVRIG мкАТ в мышинной модели карциномы толстой кишки CT26 в виде монотерапии или в комбинации с терапией анти-PDL1.

Материалы и способы

Эксперименты с опухолевым заражением:

Карцинома толстой кишки CT26 была приобретена у ATCC (CRL-2638). Клетки культивировали в RPMI 1640 (Biological Industries, 01-100-1 A) с 10% FBS (Biological Industries, 04-127-1A) и 100 мкг/мл пенициллина/стрептомицина (Biological Industries, 03-031-1B). Для имплантации опухоли клетки собирали, промывали, подсчитывали и суспендировали до 10^7 клеток/мл в холодной RPMI 1640 и помещали на лед. Мышей BALB/c ((самка, 8-нед.) Envigo) подвергали анестезии с использованием 10% кетамина (Clorketam, SAGARPA Q-7090-053) и 10% ксилазина (Sedaxylan; BE-V254834), инъекционного внутривентриально. Затем спину мышей брили и дезинфицировали 70%-ным раствором этанола. Опухолевые клетки вводили в виде $50 \text{ мкл} \times 10^5$ клеток CT26 подкожно в заднюю часть правого бока мышей. Введение мкАТ начинали на 4-е сутки (монотерапия) или 7-е сутки (комбинированная терапия) после инокуляции опухоли, когда опухоли имели объем 30-50 мм³ (монотерапия) или достигали объема 60-90 мм³ (комбинированная терапия); и вводили внутривентриально (и/п) в конечном объеме/инъекции 200 мкл, в течение 3 недель в общей сложности 6 введений. Рост опухоли измеряли электронным циркулем каждые 2-3 суток и описывали как $0,5 \times W^2 \times L \text{ мм}^3$. Мышей умерщвляли CO₂ при любом завершении исследования или в любой из следующих клинических конечных точек: объем опухоли $\geq 2250 \text{ мм}^3$, истощение опухоли, потеря массы тела $\geq 20\%$ или внешний вид умирающего

Антитела:

Показано, что химерные антитела против PVRIG мыши (мкАТ 406 и мкАТ 407), используемые в

этом исследовании, сконструированные как изотипическое моноклональное антитело IgG2b крысы (мкАт), связываются с 293НЕК-трансфектантами, экспрессирующими mPVRIg, и блокируют связывание mPVRL2 с этими клетками. Ингибитор mIgG1 к PDL-1 мыши, используемый в этом исследовании, был мкАт YW243.55.S70. Антитело YW243.55.S70 представляет собой анти-PD-L1, описанное в WO 2010/077634 (последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепей, изображенные в SEQ ID NO: 20 и 21, соответственно, WO 2010/077634) и имеют последовательность, описанную в нем.

Все мкАт были составлены в стерильном PBS с низким содержанием эндотоксина (<0,05 ЕЭ/мг).

Таблица 8. Протестированные мкАт.

IgG1 мыши, к изотипический контроль. (MOPC-21)	BP0083	BioXcell
IgG2b крысы, к изотипический контроль. (LTF-2,)	BP0090	BioXcell
Эталонное анти-PDL-1 (mIgG1)	YW243.55.S70	Compugen inc.
Анти-CGEN PVRIg мкАт 406 (IgG2b крысы)	BOJ-5C7-B3	ALDEVERON
Анти-CGEN PVRIg мкАт 407 (IgG2b крысы)	BOJ-5G4-F4	ALDEVERON

Дизайн исследования

Монотерапия

Восьминедельные самки мышей BALB/c были приобретены у Envigo и содержались в свободном от патогенной микрофлоры (SPF) виварии в течение 1 недели до начала эксперимента. Мышей подвергали анестезии, выбривали и инокулировали подкожно 50 мкл 5×10^5 опухолевых клеток CT26. На 4-е сутки после инокуляции опухоли мышей случайным образом распределяли в группы лечения n = 10 (как описано ниже). Мыши получали лечение мкАт (как подробно описано ниже) путем инъекции на 4, 7, 11, 14, 18 и 21 сутки после инокуляции. Рост опухоли измеряли с помощью циркуля каждые 2-3 суток.

Таблица 9. Группы лечения

№ группы	Лечение/мкАт	Доза (мг/кг)	№ дозы	Объем/доза (мкл)
1	Носитель		6	200
2	mIgG1 iso Ctrl	5	6	200
3	IgG2b крысы iso Ctrl	10	6	200
4	Анти-PDL-1 mIgG1	5	6	200
5	Анти-mPVRIg мкАт 406 rIgG2b	10	6	200
6	Анти-mPVRIg мкАт 407 rIgG2b	10	6	200

Комбинированная терапия

Для комбинированной терапии анти-mPVRIg и анти-mPDL-1 мкАт. Мышей лечили, как описано в монотерапии. На 7-е сутки после инокуляции опухоли мышей случайным образом распределяли в группы лечения n = 10, как описано ниже. Мыши получали лечение мкАт (как подробно описано ниже) путем инъекции на 7, 11, 14, 18, 21 и 25 сутки после инокуляции опухоли.

Таблица 10. Лечебные дозы

# Групп-па	Лечение/мкАт 1	Доза (мг/кг)	Лечение/мкАт 2	Доза (мг/кг)	# Доза	Объем/доза (мкл)
7	mIgG1 iso Ctrl	5	IgG2b крысы iso Ctrl	10	6	200
8	Анти-PDL-1 mIgG1	5	IgG2b крысы iso Ctrl	10	6	200
9	Анти-PDL-1 mIgG1	5	Анти-mPVRIg мкАт 406 rIgG2b	10	6	200
10	Анти-PDL-1 mIgG1	5	Анти-mPVRIg мкАт 407 rIgG2b	10	6	200

Статистический анализ:

Двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями, за которым следует двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями для выбранных пар групп с использованием программного обеспечения JUMP (Statistical Discoveries TM). Анализ измерений роста опухоли проводили путем сравнения объемов опухолей, измеренных в последний день, когда все исследуемые животные оставались живыми. Статистические различия в процентах от мышей без опухолей определяли с помо-

щью логарифмического рангового критерия по Мантелу-Коксу. Значения $P < 0,05$ считались значимыми.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Для каждого эксперимента количество выполненных повторов и количество животных на группу описаны на соответствующей легенде(ах) фигур(ы) (фиг. 47-48).

Результаты

Монотерапевтическая активность анти-mPVRlg и анти-mPDL-1 в сингенной модели опухоли CT26

Мы начали доклиническую оценку монотерапии анти-mPVRlg и анти-mPDL-1 в мышинной сингенной модели опухоли CT26. Мы лечили мышей анти-PDL-1 антителом изотипа mIgG1 (YW243.55.S70) или с анти-mPVRlg изотипа rIgG2b (мкАт 406 и 407).

В модели полутерапевтического лечения карциномы толстой кишки CT26 монотерапия анти-PDL-1 была в значительной степени эффективной ($P < 0,0001$), вызывая 70% TGI по сравнению с контрольным изотипом mIgG1, более высокие показатели отторжения опухоли с быстрым отторжением опухоли и продолжительным противоопухолевым иммунитетом, наблюдаемым у большинства мышей (фиг. 63A+B).

Группы, получавшие лечение мкАт 406 анти-mPVRlg, и анти-mPVRlg мкАт 407, продемонстрировали аналогичные скорости роста опухоли без TGI по сравнению с изотипом rIgG2b (фиг. 63A+B). Соответственно, лечение анти-PDL-1 mIgG1 удлиняло выживаемость мышей ($P < 0,01$, фиг. 63с), при этом у 5 из 10 особей демонстрировало полный опухолевый клиренс (фиг. 63b). Влияние анти-mPVRlg мкАт на показатели выживаемости не обнаружено.

Активность комбинации анти-PVRlg и анти-PDL-1 в сингенной мышинной опухолевой модели

Затем мы оценили активность комбинированной терапии анти-PVRlg и анти-PDL-1 в сингенной мышинной опухолевой модели.

В модели терапевтического лечения карциномы толстой кишки CT26 введение анти-PDL-1 с лечением изотипическим контролем rIgG2b, инициированное на 7-е сутки после инокуляции, не было эффективным, тогда как комбинация анти-PVRlg мкАт 407 с анти-PDL-1 вызывала значительную TGI (56%, $P = 0,0005$), более высокие показатели отторжения опухоли у 4 из 10 особей, демонстрирующих полный опухолевый клиренс (фиг. 64A+B) и способствовали лучшей противоопухолевой активности с обнаруженным устойчивым противоопухолевым иммунитетом ($P < 0,01$, фиг. 64C). Комбинация анти-PVRlg мкАт 406 с анти-PDL-1 было частично эффективной, что привело к 33% TGI, однако зарегистрированный противоопухолевый ответ был транзистентным и не влиял на выживаемость.

Выводы

Предполагалось, что mPVRlg будет играть роль новой молекулы, подобной B7, и, таким образом, в качестве потенциальной мишени для иммунотерапии на основе антител. Несколько экспериментальных систем человека *in vitro* продемонстрировали иммуномодулирующий эффект для mPVRlg. В исследованиях, представленных в этом отчете, мы оценили противораковый эффект *in vivo* мкАт, направленного против mPVRlg. В нашем исследовании лечение 10 мг/кг (200 мкг/мышь) анти-mPVRlg в качестве монотерапии при минимальном развитии заболевания, то есть начало лечения на 4-е сутки (средняя опухоль 40 мм³), не привело к TGI или выживанию в то время как положительный контроль анти-PDL-1 мкАт продемонстрировал значительный TGI и привел к пролонгированной выживаемости.

Анти-mPVRlg мкАт тестировали также в комбинации с лечением анти-PDL-1. Лечение 10 мг/кг (200 мкг/мышь) начинали на 7-е сутки, когда опухоли достигают среднего размера 75 мм³. Комбинированная терапия анти-mPVRlg мкАт 407 с анти-PDL-1 в терапевтической модели CT26 продемонстрировала ингибирование роста опухоли и пролонгированную выживаемость мышей, получавших лечение. Влияние на рост опухоли варьировалось между отдельными мышами: некоторые особи демонстрировали полный опухолевый клиренс, в то время как другие особи демонстрировали частичный ответ (временное TGI), и некоторые особи не отвечали. Влияние *in vivo* комбинированного лечения анти-mPVRlg и анти-mPDL-1 было также показано на опухолевых моделях MC38 и B16-D^b/gp100 (данные не показаны).

Дополнительные исследования *in vivo* планируются для оценки зависимости от дозы и эффективности в дополнительных сингенных моделях или в комбинации с дополнительными лечебными соединениями или схемами лечения.

Ж. Пример 10: Открытие терапевтического антитела к TIGIT при помощи фагового дисплея

1. Введение

Была проведена кампания по обнаружению антител фаговым дисплеем, чтобы изолировать связывающие вещества TIGIT человека из библиотеки наивных fab с использованием рекомбинантного внеклеточного домена TIGIT человека в качестве целевого антигена. Сорок пять новых антител, специфических к TIGIT человека, было выделено и создано в виде IgG4 человека, включая необязательный S241P в шарнирной области, как обсуждалось в данном документе. Полученные антитела подвергали скринингу на их способность блокировать взаимодействие TIGIT-PVR и на перекрестную реактивность с экспрессируемыми клетками TIGIT яванского макака с помощью проточной цитометрии. Два из этих антител были дополнительно оптимизированы для повышения аффинности связывания TIGIT человека и яванского макака.

2. Протоколы

Антигены для обнаружения антител с помощью фагового дисплея: в качестве антигенов в фаговом дисплее использовались два формата человеческого белка TIGIT. Первый из них состоял из ВКД TIGIT человека (Met22 - Pro141), слитого с С-концевой полигистидиновой меткой (hTIGIT-HIS), и или был получен собственными силами, или был коммерчески получен от Sino Biological Inc. Второй формат антигена, состоящий из ВКД TIGIT человека, слитого с доменом Fc IgG1 человека на С-конце (hTIGIT-hFc) и или был произведен собственными силами, или получен коммерчески от R&D Systems.

Функциональный ОС антигенов: рекомбинантные антигены TIGIT, используемые для биопэннинга, были функционально подтверждены их способностью связываться с PVR человека, лигандом TIGIT человека. Биотинилированные антигены тестировали на связывание PVR или с помощью ИФА, или с помощью проточной цитометрии. Биотинилированный hTIGIT-HIS был подтвержден по его способности связывать hPVR-hFc (Sino Biological Inc.) с помощью ИФА. Биотинилированный hTIGIT-hFc был подтвержден при помощи проточной цитометрии по его способности связывать эндогенно поверхностно экспрессируемый PVR на клетках Expi293.

Фаговый пэннинг библиотеки человеческих антител: были выполнены две фаговые кампании, в которых использовали или человеческий TIGIT-HIS (кампания 1), или человеческий TIGIT-hFc (кампания 2) в качестве антигенов. Реакции пэннинга проводили в растворе, используя магнитные гранулы, покрытые стрептавидином, для отображения биотинилированных антигенов TIGIT. В обеих кампаниях для первоначального обнаружения использовали библиотеку фагового дисплея человеческих fab антител. Три раунда пэннинга проводили с использованием соответствующих человеческих антигенов TIGIT с более высокой степенью отмывки и более низкой концентрацией антигена в каждом последующем раунде пэннинга. Антитело CPA.9.002, полученное в кампании 1, было оптимизировано для улучшения связывания TIGIT человека, путем создания фаговой библиотеки при помощи насыщающего мутагенеза L-CDR3 и пэннинга полученной библиотеки против человеческого TIGIT-HIS (кампания 3). Два антитела, CPA.9.059 и CPA.9.027, полученные в кампаниях 2 и 3, соответственно, также были оптимизированы для улучшения аффинности к TIGIT человека и перекрестной реактивности TIGIT яванского макака (кампания 4). Для каждого антитела фаговую библиотеку генерировали путем насыщающего мутагенеза двух CDR (любая комбинация H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1 или L-CDR3). Полученные библиотеки фагов были подвергнуты четырем раундам против TIGIT-HIS человека и С-концевого HIS-меченного ВКД TIGIT яванского макака рекомбинантного белка в чередующихся раундах пэннинга. Используемые для пэннинга антигены были следующими: 1 нМ TIGIT-HIS человека в раунде 1, 1 нМ TIGIT-HIS яванского макака в раунде 2, 0,1 нМ TIGIT-HIS человека в раунде 3 и 0,1 нМ TIGIT-HIS яванского макака в раунде 4.

Скрининг связывания с использованием антител, экспрессированных в виде fab-фрагментов: Фагмидный конструктор содержит янтарный стоп-кодон, который позволяет ему функционировать как вектор экспрессии fab. Трансформация этих векторов в *E. coli* и индукция с изопропил-D-1-тиогалактопиранозидом (IPTG) приводит к периплазматической экспрессии растворимых Fab-молекул. Белки Fab, секретируемые в периплазму *E. coli*, экстрагировали осмотическим шоком для скрининга связывания.

Первичный скрининг с помощью ИФА: экстракты fab PPE были протестированы на связывание с антигеном для пэннинга hTIGIT-HIS или hTIGIT-hFc с помощью ИФА. Положительные результаты из скрининга ИФА секвенировали с использованием праймеров специфических к тяжелой цепи и легкой цепи. Последовательности были собраны и проанализированы. Клоны считались уникальными по последовательности, если было отмечено несколько неконсервативных различий в CDR3 тяжелой цепи.

Вторичный скрининг методом проточной цитометрии: уникальные по последовательности ИФА-положительные fab-клоны были выбраны и проанализированы на их способность связывать клетки Expi293, сверхэкспрессирующие TIGIT человека, с помощью проточной цитометрии. Исходные клетки Expi293 использовали как отрицательный контроль для каждого образца fab.

Переформатирование положительных fab и производство в виде молекул IgG4 человека: потенциальные TIGIT человека, которые связывают fab, превращали в полноразмерный IgG4 человека (включая шарнирный мутант S241P, см. Aalberse et al, Immunology 202 105: 9-19, включенной в данный документ посредством ссылки в целом, и, в частности, для обсуждения S241P, и ссылок 1, 2 и 3, цитируемых в нем) для дальнейшей характеристики. Экспрессирующие белки конструкции были получены путем ПЦР-амплификации последовательностей вариабельных областей тяжелых и легких цепей, которые субклонировали в вектор pUNO3 (Invivogen).

3. Результаты

Функциональный ОС рекомбинантных белков TIGIT человека: рекомбинантные белки hTIGIT-HIS и hTIGIT-hFc, полученные или самостоятельно, или в полученные коммерчески, были функционально подтверждены по их способности связываться с PVR человека. Человеческий PVR (Fc-конъюгированный) продемонстрировал дозозависимое связывание с биотинилированным hTIGIT-HIS в ИФА (данные не показаны). Аналогичное связывание наблюдали в обратной ориентации, где PVR иммобилизовали на планшете для ИФА, и hTIGIT-HIS был в растворе (данные не показаны).

Белок hTIGIT-hFc был функционально подтвержден путем связывания с PVR в анализе методом проточной цитометрии. В этом анализе белок hTIGIT-hFc титровали против клеток Expi293, которые эндогенно экспрессируют PVR человека. Взаимодействие обнаруживали с использованием анти-hFc вторичного антитела, конъюгированного с флуоресцентной меткой AF647. В качестве контроля использовали нерелевантный белок Fc (данные не показаны).

Функциональные анализы проводились по ряду кандидатов, как описано в примерах ниже.

Скрининги связывания с дозреванием аффинности с использованием антител, экспрессируемых в виде Fab-фрагментов: Восемь 96-луночных планшетов с экстрагированными из периплазмы клонами были проанализированы для кампаний *de novo* (1 и 2). Семьдесят три уникальных клон были идентифицированы в кампании 1 с использованием белка hTIGIT-HIS в качестве целевого антигена. Вторичный скрининг 73 ИФА-положительных клонов методом проточной цитометрии выявил 21 положительный результат для связывания с клетками Expi293, сверхэкспрессирующими TIGIT. Аналогичный скрининг для кампании 2 (hTIGIT-HFC в качестве целевого антигена) давал 37 ИФА-положительных клонов, 24 из которых также были положительными в отношении связывания с клетками Expi293, сверхэкспрессирующими TIGIT человека, с помощью проточной цитометрии (фиг. 52).

Два 96-луночных планшета Fab-клонов (в качестве PPE) подвергали скринингу для кампаний по оптимизации/аффинности (3 и 4). ИФА-положительные уникальные варианты были скринированы на предмет связывания с клетками Expi293, сверхэкспрессирующими TIGIT человека и/или яванского макака, в проточной цитометрии. Аффинности связывания верхних клонов с белком hTIGIT-HIS также оценивали с помощью поверхностного плазмонного резонанса (ППР). Первый цикл аффинного созревания антитела CPA.9.002 давал 5 новых антител, CPA.9.021, CPA.9.027, CPA.9.044, CPA.9.048 и CPA.9.049, с мутациями в L-CDR3 и по меньшей мере 3-кратное улучшение аффинности связывания с рекомбинантным TIGIT человека. Второй цикл оптимизации антитела CPA.9.027 дал 4 новых антитела с по меньшей мере 25-кратным улучшением связывания с рекомбинантным TIGIT человека. Новые варианты продемонстрировали мутации в H-CDR2 и L-CDR3 (CPA.9.083 и CPA.9.086) и дополнительно в L-FR4 для CPA.9.089 и CPA.9.093. Оптимизация CPA.9.059 привела к появлению двух новых антител, CPA.9.101 и CPA.9.103, со значительно улучшенным связыванием с TIGIT яванского макака, а также значительным улучшением связывания TIGIT человека для CPA.9.103. Мутации наблюдались в H-CDR3 и L-CDR1 для обоих новых вариантов. Кроме того, незначительные изменения в L-FR1 наблюдались для CPA.9.101.

Переформатирование ИФА- и FACS-положительных Fab в hIgG4: сорок пять уникальных Fab, положительных по связыванию в ИФА и проточной цитометрии с TIGIT человека, были переформатированы для экспрессии в виде молекул IgG4 человека, включая необязательный вариант шарнира S241P, как обсуждалось в данном документе. Кроме того, 11 вариантов с оптимизированной аффинностью были также переформатированы как IgG4. Последовательности выбранных антител, полученных из фагов, изображены на фиг. 53. Последовательности двух эталонных антител, BM26 (WO 2016/028656, клон 31C6) и BM29 (US 2016/0176963, клон 22G2) также изображены на фиг. 53 для сравнения. Переформатированные антитела оценивали на связывание с клетками Expi293, сверхэкспрессирующими TIGIT человека, и для расчета равновесной константы связывания (KD) была создана кривая связывания. Эти антитела также оценивали на связывание с клетками Expi293, сверхэкспрессирующими TIGIT яванского макака, а также на их способность блокировать взаимодействие между TIGIT человека и PVR человека в клеточных анализах. Основываясь на этих характеристиках, подмножество этих антител было выбрано для функциональных анализов *in vitro*, как более подробно описано ниже.

К. Пример 11: Открытие терапевтического антитела к TIGIT при помощи гибридомы

1. Обоснование и цели

Гибридомная технология, использующая известные и стандартные методы в этой области, использовалась для генерации мышиных антител, которые связываются с TIGIT человека с высокой аффинностью, перекрестно реагируют с TIGIT примата, отличного от человека, (яванский макак, *Macaca fascicularis*, называемый супо) и блокируют взаимодействие TIGIT с его лигандом, PVR (CD155).

2. Сущность изобретения

Мышей Balb/c иммунизировали с использованием рекомбинантных форм белков внеклеточного домена TIGIT человека и яванского макака. Клетки, выделенные из селезенки и лимфатических узлов иммунизированных мышей, сливали с клеточной линией миеломы Sp2/0 для создания гибридом, которые секретируют мышиные антитела. Супернатанты из поликлональных и субклонированных моноклональных гибридом были подвергнуты скринингу на связывание с клетками Expi293, сверхэкспрессирующими TIGIT человека и яванского макака, и на аффинность связывания с рекомбинантными белками TIGIT человека и яванского макака с использованием стандартных методов ППП. Мышиные антитела из выбранных гибридом были очищены и детально охарактеризованы в исследованиях на связывание и функциональных анализах. Пять функциональных и перекрестно-реактивных с яванским макаком антител мыши были гуманизированы для того, чтобы содержать каркас hIgG4 (включая необязательный вариант шарнира, как описано в данном документе) и изотип. Последовательности изображены на фиг. 53.

L. Пример 12: Определения KD связывания антител, полученных из фага и гибридомы, связанных с клетками, сверхэкспрессирующими TIGIT человека и яванского макака, методом FACS

1. Протоколы

Следующие линии клеток были получены для оценки аффинности связывания человеческих фаговых и мышинных анти-TIGIT антител: Expi293 исходные, Expi293, сверхэкспрессирующие TIGIT человека, и Expi293, сверхэкспрессирующие TIGIT яванского макака. Следующие гибридные и фаговые антитела были приготовлены в 11-точечных 2-кратных сериях разведения в диапазоне концентрации в сайте связывания 195 пМ-200 нМ:

Антитела, полученные из фага: CPA.9.027, CPA.9.049, CPA.9.059.

Антитела, полученные из гибридомы (до гуманизации): CHA.9.536, CHA.9.541, CHA.9.543, CHA.9.546, CHA.9.547 и CHA.9.560. Были включены два разных эталонных антитела: BM26 (WO2016/028656A1, клон 31C6 в качестве IgG1 мыши) и BM29 (US2016/0176963 A1, клон 22G2 в качестве IgG1 мыши).

12-я лунка каждого титрования содержала буфер для того, чтобы служить в качестве фона. Каждый тип клеток инкубировали с мкАт против TIGIT человека в течение 60 мин при 4°C. После промывки к клеткам, инкубированным с мкАт человека и мыши, добавляли AF647-меченый козий античеловеческий F(ab') (Jackson Immunoresearch) и AF647-меченый козий антимышинный IgG-Fc (Southern Biotech # 1030-30), соответственно. После этого на приборе FACS Canto II HTS регистрировали геометрическую среднюю интенсивность флуоресценции (гСИФ) 5000-10000 событий для каждой лунки. График гСИФ как функцию от молекулярной концентрации PVR человека выравнивали с использованием модели "один сайт, специфическое связывание" Graphpad Prism для оценки KD и 95% доверительных интервалов каждой нелинейной аппроксимации.

2. Результаты

Два независимых KD методом FACS, измеренные для каждого мкАт, отличались в среднем не более чем в 2 раза. Одно иллюстративное измерение для KD вместе с 95%-ным доверительным интервалом аппроксимации изотермы связывания, пересчитанное для каждого мкАт для сверхэкспрессирующих клеток человека и яванского макака на фиг. 54 и 55 соответственно. CPA.9.059 не демонстрировало связывание со сверхэкспрессирующими клетками яванского макака. Следует отметить, что концентрации сайта связывания (2X молекулярной концентрации) для всех мкАт используются для нелинейной подгонки кривой, что означает, что сделанное предположение, что этот метод FACS KD измеряет константу сайта связывания (KD), а не молекулярную или стехиометрическую константу связывания.

М. Пример 13: Анализ блокирования при помощи FACS полученных из фага и гибридомы МКАТ против TIGIT человека, которые ингибируют связывание PVR-FC с TIGIT 1.

Введение

Цель этого анализа состоит в том, чтобы охарактеризовать способность полученных из фага и гибридомы антител против TIGIT человека ингибировать связывание PVR человека с TIGIT человека, сверхэкспрессированном на поверхности клетки. Во-первых, аффинность связывания с PVR человека-TIGIT человека будет определяться при помощи FACS. Изотермы связывания показали насыщающую концентрацию PVR человека, которая использовалась для анализов блокирования. Затем клетки, сверхэкспрессирующие TIGIT человека, титровали с помощью анти-TIGIT мкАт, продуцируемых фагом и гибридомой, с последующим добавлением насыщающей концентрации PVR человека. Затем с использованием FACS измеряли связывание антитела против TIGIT человека на сверхэкспрессирующих клетках.

2. Протоколы

Анализ FACS KD.

Различные изотипы PVR-Fc человека тестировали с помощью FACS на оптимальное связывание, и определяли человеческий PVR-h1Fc (Sino Biological # 10109-H20H), а человеческий PVR-m2aFc (CompuGen) продемонстрировал наивысшие уровни связывания с клетками, сверхэкспрессирующими TIGIT человека. Два изотипа PVR были каждый разведен 2-кратным серийным разведением более, чем 11-точечных сериях титрования до конечного диапазона молекулярной концентрации 98 пМ-100 нМ. 12-я лунка каждого титрования содержала только буфер для того, чтобы служить в качестве фона. Каждый тип клеток инкубировали с мкАт в течение 60 мин при 4°C. После промывки AF647-меченый F(ab')₂-фрагмент козьего антитела против Fc человека (Jackson Immunoresearch # 109-606-098) и AF647-меченое козье антитело против IgG мыши (SouthernBiotech # 1033-31) были добавлены в лунки, которые титровали анти-TIGIT мкАт человека и мыши, соответственно. После этого на приборе FACS Canto II HTS регистрировали геометрическую среднюю интенсивность флуоресценции (гСИФ) 5000-10000 событий для каждой лунки. График гСИФ как функцию от молекулярной концентрации PVR человека выравнивали с использованием модели "один сайт, специфическое связывание" Graphpad Prism для оценки KD и 95% доверительных интервалов каждой нелинейной аппроксимации. Результаты PVR-m2aFc человека и PVR-h1Fc человека изображены на фиг. 57А и В, соответственно.

Анализ блокирования фаговых мкАт: следующие фаговые антитела hIgG4 и эталонные мкАт были приготовлены в трехточечных 5-кратных сериях разведения в диапазоне концентраций сайта связывания 267 пМ - 6,7 нМ: CPA.9.027, CPA.9.049 и CPA.9.059, а также BM26 (WO2016/028656A1, клон 31C6 в виде hIgG4) и синагис hIgG4 (отрицательный изотипический контроль).

4-я лунка каждого титрования содержала только буфер для того, чтобы служить фоном. Клетки инкубировали с мкАт в течение 15 мин при 4°C. Человеческий PVR-m2aFc (Compugen) затем инкубировали в течение 1 ч при 4°C. После промывки добавляли AF647-меченый козий антимышиный IgG (Southern-Biotech # 1033-31). После этого на приборе FACS Canto II HTS регистрировали геометрическую среднюю интенсивность флуоресценции (гСИФ) 5000-10000 событий для каждой лунки. Значения гСИФ связанного PVR человека для клеток, предварительно инкубированных с мкАт, сравнивали с значениями гСИФ клеток, предварительно инкубированных с блокирующим эталонным мкАт и неблокирующим контрольным мкАт. Если фаговое антитело уменьшало сигнал связывания PVR-m2aFc человека по сравнению с сигналом от титрования с известным неблокирующим мкАт, то антитело было охарактеризовано как блокирующее связывание PVR при этой концентрации фагового мкАт. Закономерности блокирования фаговых мкАт были аналогичны блокированию PVR эталонным BM26 (фиг. 58).

Анализ блокирования гибридных мкАт: Следующие гибридные антитела были приготовлены в 11-точечных 2,5-кратных сериях разведений в диапазоне концентраций сайта связывания 14 пМ-133 нМ: CHA.9.536, CHA.9.541, CHA.9.546, CHA.9.547, CHA.9.560, BM26 (WO 2016/028656A1, клон 31C6 как IgG1 мыши) и BM29 (US2016/0176963 A1, клон 22G2 как IgG1 мыши).

12-я лунка каждого титрования содержала только буфер для того, чтобы служить в качестве фона. Клетки инкубировали с мкАт в течение 15 мин при 4°C. Затем добавляли человеческий PVR-h1Fc (Sino Biological # 10109-H20H) и клетки затем инкубировали в течение 1 ч при 4°C. После промывки добавляли AF647-меченый F(ab')₂-фрагмент козьего антитела к Fc человека (Jackson ImmunoResearch). После этого на приборе FACS Canto II HTS регистрировали геометрическую среднюю интенсивность флуоресценции (гСИФ) 5000-10000 событий для каждой лунки. График гСИФ как функцию концентрации сайта связывания мкАт был нелинейно аппроксимирован с использованием модели "log (ингибитор) против изменяемый наклон (четыре параметра)" Graphpad Prism для оценки ИК50 каждой нелинейной аппроксимации. Этот эксперимент повторяли дважды в течение двух суток.

3. Результаты

На фиг. 58 и 59 изображено, что как фаговые, так и гибридные антитела сильно блокируют связывание PVR-Fc человека с TIGIT человека, сверхэкспрессированного на клеточной поверхности клеток Expi293. Блокирующая активность фагового и гибридного антител сопоставимо с двумя эталонными тестируемыми антителами, BM26 и BM29.

N. Пример 14: Кинетические исследования поверхностным плазмонным резонансом (ППР) связывания девяти полученных из фага и гибридомы МКАТ с TIGIT человека, яванского макака, мыши

1. Протоколы

Все эксперименты проводили с использованием прибора ProteOn XPR 36 при 22°C. Во-первых, поверхности для захвата высокой плотности были получены с козьим поликлональным антителом против Fc человека (Thermo # HI0500) и кроличьим антимышиным антителом (GE Healthcare # BR100838), соответственно, иммобилизованных по всем вертикальным полосам захвата и горизонтальным промежуточным точкам на отдельных чипах GLC с использованием стандартной аминной связи. Типичные уровни иммобилизации для античеловеческого захватывающего пкАт и антимышиного захватывающего антитела для каждого чипа GLC составляли около 5000RU. Человеческий TIGIT был получен от Sino Biologicals, в то время как мономер TIGIT мыши и мономер TIGIT яванского макака были получены самостоятельно. Очищенные мкАт, изученные для связывания с TIGIT человека, мыши и яванского макака, перечислены ниже:

Фаговые антитела: CPA.9.027, CPA.9.049 и CPA.9.059

Гибридные антитела: CHA.9.536, CHA.9.541, CHA.9.543, CHA.9.546, CHA.9.547 и CHA.9.560

Сравнительные тесты: BM26 (WO2016/028656A1, клон 31C6 как hIgG4) и BM29 (US2016/0176963 A1, клон 22G2 как hIgG4).

Каждое мкАт разбавляли до ~ 0,5 мкг/мл в подвижном буфере, который был IxPBST с фильтрованным BSA, добавляемым до конечной концентрации 100 мкг/мл. Для каждого цикла "однократной кинетики" на приборе ProteOn на одной из шести уникальных вертикальных полос захвата в течение примерно 1,5-2,5 мин было захвачено другое мкАт. После переключения буферного потока ProteOn в горизонтальное направление поверхности захвата стабилизировались в течение примерно 15-20 мин. Шесть концентраций 3-кратных серий разбавления TIGIT человека (346 пМ - 84,1 нМ), TIGIT яванского макака (371 пМ-90,2 нМ) или TIGIT мыши (382 пМ - 92,9 нМ) вводили в течение 2 мин, а затем 20 мин диссоциации при скорости потока 50 мкл/мин. Идентичный инъекционный буфер предшествовал каждой серии введенного антигена для двойного сравнения. Поверхности античеловеческих антител регенерировали двумя 30-секундными введениями 146 мМ фосфорной кислоты, и поверхности для захвата антимышиного антитела регенерировали двумя 30-секундными импульсами 10 мМ глицина, pH 1,7. Сенсограммы антигена TIGIT, введенного над захваченными мкАт, обрабатывали с использованием версии Scrubber ProteOn и соответствовали модели кинетического связывания 1:1, включая термин для переноса массы.

На фиг. 56 изображены полученные кинетические константы скорости и равновесные константы

диссоциации, где данные были достаточно надежными для оценки констант связывания (данные сенсограмм не показаны). Звездочками указаны значения k_d , которые должны поддерживаться на постоянном уровне в $1,0 \times 10^{-5}/с$. В таких случаях, как связывание клонa CNA.9.560 с TIGIT человека, кинетическая модель была способна оценить K_d , но практически невозможно точно оценить K_d порядка $1 \times 10^{-6}/с$ после только 20 мин данных о диссоциации, принимая во внимание чувствительность прибора.

О. Пример 15: Функциональные анализы анти-TIGIT антител

1. Обоснование и цели

Для того, чтобы функционально охарактеризовать способность антител против TIGIT человека ингибировать взаимодействие TIGIT и его лиганда PVR и, следовательно, усилить активацию Т-клеток человека как в монотерапии, так и в комбинации с антителом против PVRIG человека, CNA.7.518. 1.H4 (S241P).

2. Протоколы

Анализ репортерного гена люциферазы TIGIT человека/CD 155 Jurkat ИЛ-2: набор для биоанализа репортерного гена люциферазы TIGIT человека/PVR Jurkat ИЛ-2 (Promega) использовали для оценки влияния лечения антителом против TIGIT человека на активацию Т-клеток. Т-клетки Jurkat стабильно трансфицировали рекомбинантным человеческим TIGIT и репортерным геном люциферазы, управляемым элементом ответа ИЛ-2 (ИЛ-2-RE). Стимулирующими клетками были искусственные клетки CHO-K1 АПК (aAPC), экспрессирующие рекомбинантный PVR человека, и сконструированный белок поверхности клетки, предназначенный для активации TCR-опосредованного сигналинга независимым от антигена способом. После совместного культивирования этих клеток взаимодействие TIGIT человека/PVR человека ингибирует сигналинг TCR и опосредованную ИЛ-2-RE люминесценцию. Добавление антитела против TIGIT человека, которое блокирует взаимодействие TIGIT человека/PVR человека, высвобождает ингибирующий сигнал, что приводит к активации Т-клеток и ИЛ-2-RE-опосредованной люминесценции. Анализ проводили в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, клетки aAPC CHO-K1 PVR человека оттаивали на водяной бане при $37^{\circ}C$ и разбавляли в среде F-12, дополненной 10% FBS (Promega). 25000 клеток/лунку были нанесены на белые, плоскостонные подготовленные 96-луночные планшеты для культуры ткани (Costar). Затем планшеты инкубировали в течение ночи при $37^{\circ}C$. На следующий день полученные из гибридомы и фага антитела против TIGIT человека, IgG1 мыши (mIgG1) и изотипические контрольные антитела hIgG4 или эталонные (BM) антитела против TIGIT человека добавляли или в виде однократной дозы при 10 мкг/мл, или в 10-точечных, 2-кратных сериях разведений, начиная с 20 мкг/мл. Клетки Jurkat ИЛ-2-RE люцифераза TIGIT человека оттаивали на водяной бане при $37^{\circ}C$ и разбавляли средой RPMI, дополненной 10% FBS (Promega). К каждой лунке добавляли 125000 клеток Jurkat. Затем планшеты инкубировали при $37^{\circ}C$ с 5% CO_2 в течение 6 ч. После инкубации планшеты удаляли из инкубатора и оставляли для уравнивания до комнатной температуры в течение 30 минут. К каждой лунке добавляли 80 мкл люциферазного субстрата Bio-Glo (Promega) и смесь оставляли для уравнивания в течение 10 мин при комнатной температуре, защищенной от света. Люминесценцию определяли количественно на многоканальном ридере EnVision (Perkin Elmer) с ультрачувствительным люминесцентным детектором. Люминесцентный сигнал представляли в относительных световых единицах (ОСЕ).

Размножение ЦМВ-специфических человеческих $CD8^{+}$ Т-клеток: человеческие ЦМВ-реактивные мононуклеарные клетки периферической крови (МПКП) (CTL) оттаивали, ресуспендировали при 2×10^6 клеток/мл и стимулировали 1 мкг/мл пептидом ЦМВ pp65 (Anaspec) в полной среде RPMI с добавлением 2 нг/мл рекомбинантных человеческих ИЛ-2 (R&D systems) и 10 нг/мл рекомбинантных человеческих ИЛ-7 (R&D systems) при $37^{\circ}C$. Через 9 суток клетки разделяли 1:2 и клеточный цикл останавливали с низкой дозой ИЛ-2 человека (100 МЕ/мл). Частоту ЦМВ-специфических $CD8^{+}$ Т-клеток определяли с помощью тетрамера ЦМВ pp65/HLA-A2 (MBL). ЦМВ-специфические $CD8^{+}$ Т-клетки, которые были на 65-98% тетрамер-положительными, использовали в анализах между 12 и 16 сутками после стимуляции пептидом ЦМВ.

Исследование совместной культуры ЦМВ-специфических $CD8^{+}$ Т-клеток человека с клеточными линиями меланомы человека, экспрессирующими PVR человека: анализ совместной культуры *in vitro* с человеческими ЦМВ-специфическими $CD8^{+}$ Т-клетками использовали для оценки влияния антител против TIGIT человека на антигенспецифическую секрецию цитокинов. Линия целевых клеток, используемая в анализе, представляла собой HLA-A2⁺ клеточную линию меланомы, Mel624, стабильно трансдуцированную лентивирусом, содержащим ДНК PVR человека (System Biosciences). Стабильный пул из клеток Mel624, сверхэкспрессирующих PVR человека, в которые вводили пептид ЦМВ pp65 при 0,0033 мкг/мл или 0,001 мкг/мл при $37^{\circ}C$ в течение 1 ч. Клетки затем промывали и высевали по 50000 клеток/лунку. Полученные из гибридомы и фага антитела против TIGIT человека, контрольные антитела mIgG1 или изотипические антитела hIgG4 или BM антитела против TIGIT человека были добавлены в концентрации 10 мкг/мл. Человеческие ЦМВ-специфические $CD8^{+}$ Т-клетки от трех разных доноров, указанных как донор 2, донор 4 и донор 210, были размножены в соответствии с вышеприведенным протоколом. В каждую лунку добавляли 50000 человеческих $CD8^{+}$ Т-клеток. Совместные культуры инкуби-

ровали при 37°C с 5% CO₂ в течение 24 ч. После инкубации планшеты центрифугировали при 1200 об/мин в течение 1 мин и супернатант собирали. Количество человеческого интерферона гамма (ИФН-γ) в супернатанте совместной культуры измеряли с помощью проточной цитометрии с использованием цитометрического гранулотеста (BD).

Исследование совместной культуры ЦМВ-специфических CD8⁺ Т-клеток человека с клеточными линиями меланомы, экспрессирующими PVR человека и PVRL2 (CD 112) человека: комбинированный эффект антител против TIGIT человека и CHA.7.518.1.H4 (S241P), антитела против PVRIG человека на антигенспецифическую секрецию цитокинов оценивали с помощью анализа совместной культуры *in vitro* с человеческими ЦМВ-специфическими CD8⁺ Т-клетками, подобно описанному выше анализу. Линия целевых клеток, используемая в анализе, представляла собой HLA-A2⁺ клеточную линию меланомы, Mel624, которая стабильно экспрессировала PVR человека и PVRL2 человека, лиганды для TIGIT и PVRIG, соответственно, через лентивирусную трансдукцию (System Biosciences). В клетки Mel624, сверхэкспрессирующие PVR человека и PVRL2 человека, вводили пептид ЦМВ pp65 при 0,0033 мкг/мл или 0,001 мкг/мл при 37 °C в течение 1 ч. Клетки затем промывали и высевали по 50000 клеток/лунку. Полученные из гибридомы и фага антитела против TIGIT человека или BM антитело против TIGIT человека добавляли к культуре в комбинации с CHA.7.518.1.H4 (S241P) или контрольным изотипическим антителом hIgG4 при 10 мкг/мл. Человеческие ЦМВ-специфические CD8⁺ Т-клетки от трех разных доноров, указанных как донор 4, донор 25 и донор 210, были размножены в соответствии с вышеприведенным протоколом. В каждую лунку добавляли 50000 человеческих CD8⁺ Т-клеток. Совместные культуры инкубировали при 37°C в течение 24 ч. После инкубации планшеты центрифугировали при 1200 об/мин в течение 1 мин и супернатант собирали. Количество человеческого интерферона гамма (ИФН-γ) в супернатанте совместной культуры измеряли с помощью проточной цитометрии с использованием цитометрического гранулотеста (BD).

3. Результаты

Антитела против TIGIT человека усиливают сигналинг ИЛ-2: Способность полученных из гибридомы и фага антител против TIGIT человека усиливать сигналинг ИЛ-2 оценивали с помощью анализа репортерного гена люциферазы TIGIT человека/PVR человека Jurkat. На фиг. 60 и 62 изображено влияние 10 мкг/л фаговых или гибридных антител против TIGIT человека на сигналинг ИЛ-2, соответственно. Три антитела, полученные из фага, CPA.9.027, CPA.9.049 и CPA.9.059 устойчиво усиливали сигналинг ИЛ-2 по сравнению с изотипическим контролем hIgG4. Кроме того, все три фаговых антитела сильнее индуцировали сигналинг ИЛ-2 по сравнению с BM антителами против TIGIT человека, BM26 и BM29. Пять полученных из гибридомы антител, CHA.9.536, CHA.9.541, CHA.9.546, CHA.9.547 и CHA.9.560 также индуцировали сигналинг ИЛ-2 по сравнению с изотипическим контролем mIgG1. Следует отметить, что пять гибридных антител индуцировали подобный сигналинг ИЛ-2 по сравнению с BM26 и BM29. Неблокирующее антитело против TIGIT человека, CHA.9.543, незначительно увеличивало сигналинг ИЛ-2. Чтобы определить, зависит ли эффект анти-TIGIT антител от дозы, проводили анализ с использованием 10-точечных, 2-кратных серий разведений для каждого антитела, начиная с 20 мкг/мл (фиг. 61 и 63). Сигналинг ИЛ-2 снижался зависимо от дозы для всех восьми антител против TIGIT человека, а также BM26 и BM29.

Антитела против TIGIT человека увеличивают секрецию ИФН-γ из человеческих ЦМВ-специфических CD8⁺ Т-клеток: Способность полученных из гибридомы и фага антител к TIGIT человека модулировать секрецию ИФН-γ оценивали с помощью анализа совместной культуры ЦМВ-специфических Т-клеток/Mel624. На фиг. 64 изображено влияние антител против TIGIT человека на секрецию ИФН-γ. Три фаговых антитела, CPA.9.027, CPA.9.049 и CPA.9.059, усилили секрецию ИФН-γ по сравнению только со средой и изотипическим контрольным антителом hIgG4. Кроме того, пять гибридных антител, CHA.9.536, CHA.9.541, CHA.9.546, CHA.9.547 и CHA.9.560 также увеличивали продукцию ИФН-γ по сравнению с изотипическим контрольным антителом mIgG1. Фаговые и гибридные антитела к TIGIT индуцировали ИФН-γ аналогично BM26 и BM29. Как и ожидалось, неблокирующее антитело против TIGIT человека, CHA.9.543, не оказывало существенного влияния на секрецию ИФН-γ.

На фиг. 65 изображен комбинированный эффект антител против TIGIT человека и CHA.7.518.1.H4 (S241P) на секрецию ИФН-γ. Три антитела, полученные из фага, CPA.9.027, CPA.9.049 и CPA.9.059, и пять антител, полученных из гибридомы, CHA.9.536, CHA.9.541, CHA.9.546, CHA.9.547 и CHA.9.560, включая BM26, все усиливали секрецию ИФН-γ по сравнению с их соответствующими изотипическими контрольными антителами, когда их вводили по отдельности, или в комбинации с CHA.7.518.1.H4 (S241P). Неблокирующее антитело против TIGIT человека, CHA.9.543, приводило к уменьшению секреции ИФН-γ по сравнению с другими антителами против TIGIT человека. Процентное увеличение секреции ИФН-γ; для каждого антитела по сравнению с соответствующими изотипическими контрольными антителами приведены на фиг. 66. Синергетический эффект наблюдали при комбинированном лечении антителами против TIGIT человека и CHA.7.518.1.H4 (S241P).

4. Резюме и выводы

Добавление антител против TIGIT человека к анализу репортерного гена TIGIT человека/PVR чело-

века Jurkat привело к устойчивому, зависящему от дозы увеличению сигналинга ИЛ-2. Кроме того, антитела против TIGIT человека увеличивали секрецию ИФН- γ из человеческих ЦМВ-специфических CD8+ Т-клеток при совместном культивировании с клетками PVR Mel624 человека. Секрецию ИФН- γ дополнительно увеличивали антителами против TIGIT человека в комбинации с антителом против PVRIG человека. В совокупности эти данные демонстрируют, что антитела против TIGIT человека могут блокировать опосредованное TIGIT подавление активации Т-клеток человека, и активация Т-клеток усиливается совместной блокадой как TIGIT, так и PVRIG.

Р. Пример 16: Анализ сортировки анти-TIGIT антител

1. Протоколы

Эксперименты проводились компанией Wasatch Microfluidics Inc. (Солт-Лейк-Сити, Юта) с использованием Continuous Flow Microspotter (CFM) и IBIS MX96 SPR Imager (MX96 SPRi). Следующие мкАт против TIGIT человека и варианты PVR-Fc человека разводили до ~ 10 мкг/мл в 10 mM ацетате натрия, pH 5,0 и ковалентно иммобилизовали, используя стандартную аминную сшивку на независимых участках биосенсорного призматического чипа Biantensor Xantec 200M в течение 7-минутных циклов используя CFM:

1 CPA.9.009-H4	17 CPA.9.081-H4	32 CHA.9.555
2 CPA.9.011-H4	18 CHA.9.519	33 CHA.9.560
3 CPA.9.012-H4	19 CHA.9.521	34 CHA.9.525
4 CPA.9.013-H4	20 CHA.9.522	35 CHA.9.538
5 CPA.9.014-H4	21 CHA.9.527	36 CHA.9.543
6 CPA.9.015-H4	22 CHA.9.528	37 CHA.9.553
7 CPA.9.018-H4	23 CHA.9.529	38 CHA.9.556
8 CPA.9.027-H4	24 CHA.9.535	39 CHA.9.561
9 CPA.9.049-H4	25 CHA.9.536	40 BM8-H4
10 CPA.9.053-H4	26 CHA.9.541	41 BM9-H4
11 CPA.9.057-H4	27 CHA.9.546	42 BM26-H4
12 CPA.9.059-H4	28 CHA.9.547	43 BM29-H4
13 CPA.9.064-H4	29 CHA.9.549	44 MBSA43-M1
14 CPA.9.069-H4	30 CHA.9.552	45 PVR-Fc M2A
15 CPA.9.071-H4	31 CHA.9.554	46 Sino PVR-Fc
16 CPA.9.077-H4		

BM8-H4 и BM9-H4 относятся к (US2015/0216970A1, клоны 10A7 и 1F4, переформатированные как hIgG4), соответственно. MBSA43-M1 является мышинным IgG1 против TIGIT человека от eBioscience. Призматический чип затем промывали 1X PBST в течение 3 мин, а затем сразу загружали в устройство для визуализации MX96 SPRi, где избыток N-гидроксисукцинимидного эфира гасили с помощью 5-минутной инъекции 1M этаноламина. Предварительные эксперименты включали несколько циклов инъекции 100 нМ мономерного TIGIT человека (Sino Biologicals, кат. № 10917-H08H) на всех иммобилизованных мкАт в течение 4 мин с последующей регенерацией, чтобы проверить активность связывания антител и наилучшим образом определить условия регенерации с помощью оценки воспроизводимости связывания TIGIT. Данные предварительные эксперименты продемонстрировали, что лучшим реагентом для регенерации большей части иммобилизованных мкАт было 30-секундное введение 1/500 фосфорной кислоты. Однако иммобилизованный PVR не сохранил активности, и поэтому их блокирующие паттерны были сгенерированы и "отсортированы" как анализы только в растворе. В данных предварительных экспериментах и экспериментах по сортировке, описанных ниже, все образцы белка были приготовлены в подвижном буфере, который был дегазирован HBST. Был проведен протокол эпитопспецифической сортировки методом "сэндвич", где каждый мкАт и PVR вводили через TIGIT, который был в комплексе с каждым иммобилизованным мкАт, чтобы определить, блокирует ли иммобилизованное мкАт связывание мкАт с TIGIT в растворе. Для каждого цикла 100 нМ TIGIT сначала вводили с избытком всем иммобилизованным мкАт в течение 4 мин, а затем сразу вводили конкурентное мкАт или лиганд 4 мин при 274 нМ (концентрация сайта связывания). Это повторяли с каждым мкАт и PVR, действующим как конкурентное исследуемое вещество. Контрольные циклы с подвижным буфером вместо конкурентного белка выполняли через каждые 12 циклов для двойного сравнения. Все поверхности регенерировали после каждого цикла с 30-секундным введением 1/500 фосфорной кислоты. Данные сенсограмм обрабатывались и приводили с использованием проприетарного программного обеспечения Wasatch. Пару антител классифицировали как имеющие общий TIGIT-связывающий эпитоп, если не было обнаружено связывания с введением конкурента избыточного для TIGIT, которые предварительно были в комплексе с иммобилизованным мкАт. Пару антител классифицировали как связывающиеся с различными эпитопами на TIGIT или "образующие сэндвич", если инъекция конкурентного мкАт демонстрировала связывание с предварительно связанным TIGIT. Низкое или минимальное связывание конкурента классифицировали как "про-

межуточный" блокатор. Иерархическую кластеризацию парных паттернов блокирования TIGIT для каждого мкАт и лиганда выполняли с использованием проприетарного программного обеспечения Wasatch.

2. Результаты

Оба белка PVR-Fc и 13 мкАт или теряли активность, или не могли быть регенерированы в виде лигандов, поэтому их блокирующие паттерны были определены как аналиты только в растворе. МкАт CРА.9.014-Н4 не был отсортирован, поскольку он не связывался с TIGIT. На фиг. 67 изображена кластеризация дендрограмм на основе парных паттернов блокирования для каждого мкАт и двух белков PVR. Вертикальная ось представляет статистический коэффициент подобия в паттернах блокирования. В Wasatch Microfluidics применялся коэффициент отсечения равный 5 для кластеризации мкАт, который обозначен линией на фиг. 67. Для строгого определения эпигонной "группы", где только те мкАт (и PVR), которые демонстрируют одинаковые паттерны блокирования, в общей сложности существует 12 дискретных групп. Если паттерны блокирования, которые демонстрируют только минимальные различия, сгруппированы вместе, выделяют четыре тесно связанных "сообщества" мкАт и PVR. Эти "сообщества" обозначены разными затененными блоками в нижней части фиг. 67. На фиг. 68 сгруппированы вместе мкАт и PVR, которые заполняют каждую дискретную уникальную группу (бин), при этом каждая группа обозначена черным квадратом. Серые квадраты окружают все уникальные группы, которые составляют каждое "сообщество" связанных характеров/моделей блокирования. МкАт и PVR на фиг. 68 перечислены с цифровым кодом, который представляет каждый белок в дендрограмме на фиг. 67.

Q. Пример 17: Введение анти-PVRIG антител нокаутным по TIGIT мышам

Обоснование и цели

Чтобы проверить, может ли делеция TIGIT в комбинации с блокадой PVRIG мыши усилить ингибирование роста опухоли и выживаемость в сингенной модели опухоли мыши.

Протоколы

Животные

Нокаутных (КО) по TIGIT мышей получали в Ozgene Pty LTD (Австралия). В качестве контролей служили мыши C57BL/6 дикого типа (ДТ) (Ozgene). Использовали самок мышей TIGIT КО и C57BL/6 в возрасте от восьми до одиннадцати недель. Все исследования были одобрены Институциональным комитетом по уходу за животными и их использованию в Тель-Авивском университете (Тель-Авив, Израиль).

Опухолевые модели in vivo

1×10⁵ клеток меланомы B16/Db-hmgrp100 инокулировали подкожно (п/к) в правый бок мышей C57BL/6 ДТ или TIGIT КО. Лечение антителом было начато в тот же день, что и инокуляция опухоли (0 сутки), с 7-10 мышами на группу лечения. Используемые антитела были изотипическим контролем мышинового IgG1 (клон МОРС-21 BioXcell) и мышинового IgG1 против PVRIG мыши (клон 407, Compugen LTD). Антитела вводили при 10 мг/кг при помощи внутрибрюшинной инъекции, дважды в неделю в течение 3 недель. Рост опухоли измеряли электронным циркулем каждые 2-3 дня и описывали как 0,5 × W² × L мм³ (L - длина, W - ширина опухоли). Животных, у которых размер опухоли достигал 2250 мм³, подвергали анестезии.

Статистический анализ

Двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями, за которым следует двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями для выбранных пар групп выполняли с использованием программного обеспечения JUMP (Statistical Discoveries TM). Анализ измерений роста опухоли проводили путем сравнения объемов опухолей, измеренных в последний день, когда все исследуемые животные оставались живыми. Статистические различия в процентах от мышей без опухолей определяли с помощью логарифмического рангового критерия по Мантелу-Коксу. Значения P<0,05 считались значимыми. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Результаты

Ингибирование роста опухоли in vivo после лечения блокирующим антителом против PVRIG мыши у мышей TIGIT КО

Мы протестировали эффективность in vivo делеции TIGIT в комбинации с блокадой PVRIG мыши в сингенной мышинной опухолевой модели подкожной меланомы B16/Db-hmgrp100. Лечение мышей C57BL/6 ДТ, несущих опухоль, блокирующим антителом против PVRIG мыши оказывало незначительное влияние на ингибирование роста опухоли (TGI) по сравнению с лечением изотипом (17% TGI на 11-е сутки и 8% TGI в конечной точке, на 18-е сутки). Влияние делеции TIGIT на рост опухоли было незначительным по сравнению с контрольной группой C57BL/6 ДТ (17% TGI на 11-е сутки и 13% TGI в конечной точке). Однако, когда делецию TIGIT комбинировали с антителом против PVRIG мыши (клон 407), значительное TGI было очевидным (63% на 11-й сутки и 49% TGI в конечной точке) (фиг. 80А и 80В). В соответствии с TGI мыши TIGIT КО, получавшие лечение антителом против PVRIG мыши (клон 407), продемонстрировали повышенную выживаемость по сравнению с контрольной группой C57BL/6 ДТ, однако статистическая значимость не была достигнута (фиг. 80С).

Резюме и выводы

Комбинация делеции TIGIT и блокады PVRIG значительно уменьшала рост опухоли in vivo, указывая на то, что как TIGIT, так и PVRIG играют ингибирующую роль в этой опухолевой модели меланомы.

Эти данные свидетельствуют о том, что совместное нацеливание на TIGIT и PVRIG может быть еще одной комбинированной терапией, которая значительно усиливает противоопухолевые ответы.

R. Пример 18: Антагонизм PVRIG усиливает эффекторную функцию Т-клеток и уменьшает опухолевый рост

Реферат

Несмотря на последние успехи, большинство пациентов не получают долгосрочный терапевтический эффект от ингибиторов контрольных точек. PVRIG представляет собой новый иммуносупрессивный рецептор семейства DNAM/TIGIT, и мы демонстрируем в данном документе роль PVRIG в регуляции противоопухолевых ответов. PVRIG связывается с PVRL2 и демонстрирует значительно повышенную экспрессию на инфильтрирующих опухоли лимфоцитах по сравнению с лимфоцитами из нормальных тканей. Антагонизм PVRIG усиливал активацию Т-клеток человека, и комбинация PVRIG с ингибиторами PD-1 или TIGIT дополнительно синергетически повышала функцию лимфоцитов. Затем мы рассмотрели роль PVRIG в доклинических опухолевых моделях. PVRIG^{-/-} мыши продемонстрировали существенно повышенную активацию Т-клеток *in vitro* и снижение роста опухоли MC38, которое было опосредовано повышенной эффекторной функцией CD8. Антагонистическое анти-PVRIG антитело существенно уменьшало рост опухоли в комбинации с анти-PD-L1 или при тестировании у TIGIT^{-/-} мышей. Таким образом, мы демонстрируем, что путь PVRIG-PVRL2 был индуцирован при онкологических заболеваниях человека и что антагонистические взаимодействия PVRIG-PVRL2 приводили к повышению Т-клеточной функции и уменьшению роста опухоли.

Состояние значимости

Эти данные демонстрируют, что PVRIG является перспективной мишенью для лечения рака и дает обоснование для тестирования ингибитора PVRIG, CHA.7.518.1.H4 (S241P), в качестве нового агента иммунотерапии рака или в виде монотерапии, или в комбинации с блокадой TIGIT или PD1.

Введение

Увеличение доказательств свидетельствует о том, что эндогенные иммунные ответы имеют решающее значение для моделирования инициирования, прогрессирования и подавления рака (1) (2). Иммунный статус пациентов, а также содержание инфильтрирующих опухоли лимфоцитов (TIL) в микроокружении опухоли (TME) являются ключевыми прогностическими показателями не только показателей выживаемости при раке, но и того, как пациенты отвечают на терапию (3) (4). Т-клетки являются ключевым компонентом TIL, которые могут вызывать противоопухолевый ответ, и большинство противоопухолевых иммунных ответов в конечном итоге полагаются на функциональность эффекторных лимфоцитов. Обогащение CD8 Т-клеток в TME опухоли пациента, а также другие факторы, которые смещают иммунный ответ на эффективный ответ CD8 Т-клеток, такие как мутационная нагрузка и Th1-поляризованное TME, являются ключевыми прогностическими показателями для благоприятного противоопухолевого иммунного ответа (5) (6).

Ключевое наблюдение во многих солидных опухолях состоит в том, что эффекторные Т-клетки имеют активированный или "истощенный" фенотип в TME (7). Это указывает на то, что хотя Т-клетки внутри TME имеют изначально видимый когнатный антиген, будучи активированными и перемещенными в опухоль, они впоследствии не способны вызвать эффективный противоопухолевый ответ. Предварительно активированные или истощенные Т-клетки определяются повышенной поверхностной экспрессией коингибирующих рецепторов, таких как PD-1 и CTLA-4 (8). Терапевтически нацеливание на эти коингибирующие рецепторы антителами, которые ингибируют взаимодействие с их когнатными лигандами, продемонстрировали существенную клиническую эффективность у пациентов с множественными распространенными злокачественными опухолями (9). Механически показано, что нацеливание на эти коингибирующие рецепторы приводит к размножению уже опухолереактивных Т-клеток, которые существовали ранее в TME, и к образованию пулов Т-клеток с расширенным разнообразием Т-клеточных рецепторов (10) (11) (12). Несмотря на то, что на данный момент ингибиторы контрольных точек произвели революцию в лечении рака и продемонстрировали мощь иммунной системы в борьбе с раком, многие пациенты все еще имеют рецидив и/или не отвечают на лечение. Следовательно, более глубокое понимание иммунного ответа при раке и нацеливание на дополнительные пути, основанные на иммунитете, приведут к дополнительным терапевтическим методам.

Среди этих новых путей группа рецепторов и лигандов внутри семейства нектинов и нектиноподобных молекул в настоящее время изучается как потенциальные новые противораковые иммунотерапии. Рецепторы в этом семействе включают DNAM-1 (CD226), CD96 (TACTILE), TIGIT и совсем недавно PVRIG (CD112R) (13) (14) (15). Из этих молекул DNAM является активирующим рецептором в этом подсемействе, связывающимся с 2 лигандами, PVR (CD155) и PVRL2 (CD112), для доставки активирующего сигнала в лимфоциты (16). Было показано, что два рецептора в этом семействе ингибируют функцию лимфоцитов человека, TIGIT, а в последнее время PVRIG (17) (18). Сообщается, что TIGIT имеет высокое аффинное взаимодействие с PVR, значительно более слабую аффинность к PVRL2, и было показано, что он ингибирует как Т-клеточный, так и NK-клеточный ответ, доставляя ингибирующий сигнал в лимфоциты через его мотив ITSM (19) (20). Позднее было показано, что PVRIG связывается с высокой аффинностью с PVRL2 и доставляет ингибирующий сигнал через его мотив ITIM (15). В обоих

случаях аффинность TIGIT к PVR и PVRIG к PVRL2 выше, чем аффинность DNAM к PVR или PVRL2, что указывает на то, что TIGIT и PVRIG могут превзойти в конкурентной борьбе PVR и PVRL2 из DNAM, обеспечивая не прямой механизм, с помощью которого TIGIT и PVRIG могут уменьшить Т-клеточную функцию. Внутри этого семейства PVR также является лигандом для CD96. Сообщалось, что функция CD96 является ингибиторной на лимфоцитах мыши (21), но является активационной на лимфоцитах человека (22). Основываясь на этих данных, мы постулируем, что в человеческих лимфоцитах 2 рецептора, TIGIT и PVRIG, связываются с высокой аффинностью с PVR и PVRL2 соответственно, чтобы доставлять ингибирующие сигналы для ослабления Т-клеточной функции.

Несмотря на то, что в одном недавнем отчете было показано, что человеческий PVRIG ингибирует Т-клеточный ответ, роль PVRIG и PVRL2 в иммунном надзоре рака недостаточно изучена. В частности, не приводится профиль экспрессии этого пути при онкологических заболеваниях и роль PVRIG в регуляции противоопухолевых ответов CD8 Т-клеток. Более того, функциональная характеристика гена PVRIG мыши и влияние нарушения взаимодействия PVRIG-PVRL2 *in vivo* в доклинических опухолевых моделях опухолей не приводится. В этом контексте мы выяснили роль PVRIG в развитии рака, сообщая о профиле экспрессии PVRIG и PVRL2 при раке, а также о влиянии антагонизма PVRIG на исследования совместной культуры опухолевых клеток и в доклинических опухолевых моделях. Мы демонстрируем, что PVRIG имеет дифференцированный профиль экспрессии на субпопуляциях Т-клеток по сравнению с TIGIT или CD96 и что экспрессия PVRIG и PVRL2 индуцируется при раке по сравнению с нормальными соседними тканями. В многочисленных системах анализа человека *in vitro* высокоаффинное антагонистическое моноклональное антитело к PVRIG (CHA.7.518.1.H4 (S241P)) улучшало Т-клеточную функцию, в частности, в комбинации с анти-TIGIT или анти-PD1 антителом. Кроме того, мы сообщаем о новой характеристике мышинного PVRIG с использованием антагонистических антител или дефицитных по PVRIG мышей и демонстрируем, что ингибирование взаимодействия PVRIG-PVRL2 уменьшает рост опухоли, что имеет наиболее сильный эффект в комбинировании с ингибированием PD-1 или генетическим дефицитом TIGIT. В совокупности эти данные демонстрируют, что PVRIG является критическим ингибиторным рецептором в регуляции Т-клеточных противоопухолевых ответов и поддерживает развитие CHA.7.518.1.H4 (S241P) для клинических испытаний у больных раком.

Материалы и способы

Исследование периферической крови человека и экспрессии опухоли

МКПК здоровых доноров-людей были получены в Стэнфордском университете в соответствии с Хельсинкской декларацией. Ткани человека были предоставлены Сетью по вопросам тканей человека, поддерживаемом ресурсом Национального института рака. Раковые ткани человека и соответствующие нормальные смежные ткани были диссоциированы на отдельные клетки согласно протоколу производителя (Miltenyi Biotec). Диссоциированные клетки анализировали с помощью проточной цитометрии для экспрессии различных мишеней на разных субпопуляциях клеток. Для каждой экспрессии мишени на отдельной субпопуляции клеток значение кратной экспрессии было рассчитано путем деления значения СИФ мишени на значение СИФ изотипического контроля. Другие исследователи, возможно, получили образцы из этих же образцов ткани. Тип опухоли определяли на основании анализа отчета о патологии для каждого образца. Для ИГХ исследований анти-PVRL2 антитело (HPA-012759, Sigma) и PD-L1 (Sp142, SpringBio) использовали для микроанализов окрашенных опухолей (Biochain Institute) с использованием условий, описанных в дополнительных методах. Оценку выполняли 2 независимыми рецензентами на дублированных биоптатах из той же опухоли.

Создание и характеристика антител к PVRIG

Антитела против PVRIG человека и против PVRIG мыши были получены, как описано в дополнительных способах. Вкратце, специфичность связывания и аффинность антител оценивали при помощи селективного связывания с PVRIG-модифицированными клетками без детектируемого связывания с клетками, которые не экспрессируют данный ген. Антагонистическую активность этих анти-PVRIG антител определяли с помощью анализов на основе ИФА и проточной цитометрии, в которых было нарушено взаимодействие PVRIG с PVRL2. Для характеристики в клеточных анализах антитела тестировали в нескольких системах анализа совместной культуры Т-клеток с клетками-мишенями, состоящей из клеток-мишеней, которые экспрессируют PVRL2 в культуре с помощью МКПК или Т-клеток, полученных из опухоли. gp100-специфические линии Т-клеток были размножены из опухолей меланомы, как описано выше (23). CMVpp65-реактивные Т-клетки были размножены из МКПК здоровых доноров (CTL immunospot) с CMVpp65 (495-503), ИЛ-2 и ИЛ-7 в течение 10 суток. Для комбинированных исследований использовали антитела к PD-1, TIGIT и PVRIG при концентрации 10 мкг/мл. Концентрации цитокинов в кондиционированных средах определяли с использованием метода цитометрического гранулярного анализа (СВА), и FACS-окрашивание выполняли как описано в дополнительных способах.

Характеристика экспрессии и функции PVRIG мыши

Связывающие взаимодействия PVRIG мыши с mPVRL2 и mPVR оценивали с помощью ППР и ИФА с использованием рекомбинантных белков PVRIG, PVRL2 и PVR и с помощью FACS с использованием эктопически модифицированных клеточных линий, сверхэкспрессирующих PVRIG и PVRL2, или клеточных линий, трансфицированных кРНК PVR или PVRL2. PVRIG- и TIGIT-дефицитных мышей

получали как описано в дополнительных способах. Анализ экспрессии проводили для изучения экспрессии PVRIG в селезенке, лимфатическом узле и опухоли в различных субпопуляциях клеток. Клеточные функциональные анализы, демонстрирующие модуляционную активность Т-клеток для мышинового PVRIG, были установлены с использованием ДТ и PVRIG^{-/-} Т-клеток и клеток-мишеней, эктопически экспрессируемых PVRL2 Fc или PVRL2, как описано в дополнительных материалах и способах. Опухолевые модели CT26, MC38 и B16/Db-hmgrp100 выполнялись, как описано в дополнительных методах. Все исследования были одобрены Институциональным комитетом по уходу за животными и их использованию и в Тель-Авивском университете (Тель-Авив, Израиль) или Университете Джона Хопкинса (Балтимор, США).

Результаты

Экспрессия PVRIG является самой высокой на эффекторных Т-клетках периферической крови и опухолей.

Суперсемейство Ig (IgSF) состоит из сотен белков, но только некоторые из них являются ингибиторами Т-клеточных рецепторов. Белки IgSF быстро развиваются (24), и поэтому сходство последовательностей среди этих белков обычно низкое и не является оптимальным для идентификации новых иммунных рецепторов. Для выявления новых иммунных контрольных точек мы разработали биоинформационные алгоритмы, основанные на общих геномных и протеомных характеристиках среди известных иммунных контрольных точек, таких как структура генов, белковые домены, спрогнозированная клеточная локализация и паттерн экспрессии. Используя эти алгоритмы, PVRIG был идентифицирован как новый иммунный рецептор. Недавно в докладе также было показано, что человеческий PVRIG (CD112R) связывается с PVRL2 и ингибирует Т-клеточную функцию (15). Тем не менее, значимость этого пути в регуляции иммунного надзора опухоли не приводится. В данном контексте мы выяснили экспрессию и функцию PVRIG и PVRL2 при онкологических заболеваниях человека и доклинических опухолевых моделях. В периферической крови от здоровых доноров PVRIG экспрессировали исключительно на лимфоцитах с наибольшей экспрессией на CD8 Т-клетках и NK-клетках (фиг. 83А). Дальнейший анализ субпопуляций Т-клеток продемонстрировал наивысшую экспрессию PVRIG на субпопуляциях CD8 или CD4 Т-клеток памяти/эффекторных клеток по сравнению с субпопуляцией регуляторных Т-клеток (фиг. 83В, фиг. 90А). Преобладающий паттерн экспрессии Т-клеток памяти отличает PVRIG от других рецепторов в семействе (TIGIT, CD96), которые имеют тенденцию иметь равную или более высокую экспрессию на регуляторных Т-клетках по сравнению с Т-клетками памяти/эффекторными Т-клетками. Мы дополнительно сравнили кинетику экспрессии активации PVRIG и TIGIT после активации Т-клеток в 2 системах анализа (ответ на стимуляцию ЦМВ на фиг. 83С, DC-MLR, фиг. 83D, фиг. 90В) и показали, что PVRIG имеет задержку кинетики индукции и более устойчивую экспрессию в поздней временной точке по сравнению с TIGIT. Предпочтительная экспрессия PVRIG на клетках памяти/эффекторных клеток по сравнению с TIGIT указывает на уникальную роль PVRIG в регуляции Т-клеточных ответов.

Замедленная и устойчивая индукция экспрессии PVRIG на Т-клетках после активации дает основание предполагать, что он может быть экспрессирован в микроокружении опухоли. Затем мы проанализировали экспрессию PVRIG на лейкоцитах из диссоциированных опухолей человека непосредственно *ex vivo* с помощью FACS. Экспрессия PVRIG была обнаружена на CD8 Т-клетках, CD4 Т-клетках и NK-клетках из нескольких типов опухолей (фиг. 83Е-Г, фиг. 90С). PVRIG совместно экспрессировался с PD-1 и TIGIT на CD4 и CD8 Т-клетках (фиг. 83F). В среднем более высокая экспрессия была обнаружена на CD4⁺ и CD8⁺ TIL из опухолей молочной железы, эндометрия, головы и шеи, легкого, почки и яичников по сравнению с мочевым пузырем, толстым кишечником и предстательной железой. В образцах опухолей, в которых экспрессия PVRIG была низкой/отсутствовала *ex vivo*, активация анти-CD3 и анти-CD28 усиливала экспрессию PVRIG, предполагая, что экспрессия PVRIG в TIL может быть дополнительно индуцирована при повторной активации (фиг. 90D). Для опухолей толстой кишки, легкого, почки, эндометрия и яичников мы смогли получить нормальную смежную ткань у того же пациента и провести сравнение экспрессии PVRIG на лимфоцитах, выделенных из опухоли против нормальной ткани. TIL продемонстрировали значительную индукцию PVRIG на CD4 и CD8 Т-клетках по сравнению с клетками, выделенными из соответствующих нормальных смежных тканей (NAT) (фиг. 90Е). Как и в случае МКПК мы дополнительно сравнивали экспрессию PVRIG, TIGIT и PD1 на регуляторных Т-клетках против CD8 Т-клеток из опухолей легкого, эндометрия и почки. На TIL экспрессия TIGIT была выше на регуляторных Т-клетках по сравнению с CD8 Т-клетками, тогда как для PVRIG и PD1 аналогичная или более высокая экспрессия наблюдалась на CD8 Т-клетках по сравнению с регуляторными Т-клетками (фиг. 83H). Затем мы исследовали совместную регуляцию PVRIG, TIGIT и PD-1 на популяции Т-клеток путем корреляционного анализа или величины экспрессии на TIL *ex vivo*, или величины кратного изменения в экспрессии между опухолью и NAT. В обоих анализах CD4 и CD8 Т-клетки проявляли положительную и значительную корреляцию между PVRIG и PD1 или TIGIT (фиг. 90F). В совокупности эти данные демонстрируют, что PVRIG экспрессируется на Т-клетках и NK-клетках из-за множественных онкологических заболеваний человека, делая PVRIG в качестве нового целевого ингибиторного рецептора, которая может иметь решающее значение для регуляции функции Т-клеток в опухоли.

Экспрессия PVRL2 усиливается в ткани опухолей по сравнению с нормальной смежной тканью.

Как было продемонстрировано, экспрессия PD-L1 помогает спрогнозировать ответы на ингибиторы PD-1, мы исследовали, была ли экспрессия PVRL2 связана с экспрессией его когнатного рецептора PVRIG в раковых тканях человека. Используя анти-PVRL2 антитело, которое мы проверяли для окрашивания образцов FFPE (фиг. 91A), мы окрашивали опухолевые тканевые матрицы (ТМА), состоящие из тканей легкого, толстой кишки, кожи, груди, яичников/эндометрия и почек, и оценивали каждый биоптат на основе распространенности и интенсивности экспрессии PVRL2. Экспрессия PVRL2 отсутствовала или минимально экспрессирована в большинстве образцов нормальной ткани из этих органов. В опухолевых тканях экспрессия PVRL2 на опухолевые клетки была обнаружена в ~50-70% онкологических заболеваний легкого, толстой кишки, молочной железы и яичника/эндометрия (фиг. 84A, 84F). Экспрессия в образцах рака почки варьировалась от 20 до 40%, тогда как экспрессия в меланоме была самой низкой (~10%) (фиг. 84A, 84F). Экспрессия PVRL2 была обнаружена на опухолевых клетках и иммунных клетках на инвазивном фронте (фиг. 84B). Для определения специфических субпопуляций иммунных клеток, экспрессирующих PVRL2, мы выполняли проточную цитометрию на свежедиссоциированные опухоли. Экспрессия PVRL2 была обнаружена на CD45⁺ иммунных клетках, в частности миелоидных клетках (например, CD14⁺ опухоль-ассоциированные макрофаги (TAM) и миелоидные ДК) и на CD45- неиммунные клетки из нескольких типов опухолей (фиг. 84C, D). На лимфоцитах не обнаружено экспрессии PVRL2 (данные не показаны). Сравнение экспрессии PVRL2 на CD45- клеток и TAM, выделенный из опухолей толстой кишки, легкого, почки, эндометрия, и яичников продемонстрировали значительную индукцию PVRL2 на клетках, выделенные из опухоли по сравнению с клетками, выделенными из соответствующего NAT одного и того же донора (фиг. 92). Для образцов, где мы получили экспрессию PVRIG и PVRL2, мы исследовали экспрессию PVRIG на лимфоцитах по сравнению с PVRL2 на миелоидных и на CD45⁺ клетках из нескольких типов опухолей. Из исследованных типов раковых опухолей, опухоли эндометрия, легкого и почки имели наибольший показатель распространенности PVRIG^{hi} лимфоцитов и PVRL2^{hi} TAM или CD45- неиммунных клеток (фиг. 84E, 93). Интегрируя данные исследований ТМА и диссоциированных опухолей, мы демонстрируем, что опухоли молочной железы, эндометрия, легкого, головы и шеи, почки и яичника могут представлять собой чувствительный к антагонизму PVRIG тип опухоли.

По сравнению с PD-L1 экспрессия PVRL2 дифференциально регулируется и присутствует в PD-L1⁺ опухолях

Поскольку PVRIG и PD-1 могут быть совместно экспрессированы на инфильтрирующих опухоли лимфоцитах (TIL), мы также исследовали совместную экспрессию PVRL2 и PD-L1 на одной и той же опухоли путем окрашивания последовательных срезов того же ТМА. Экспрессия PVRL2 на опухолевых клетках был явно обнаружена в PD-L1⁺ опухолевых образцах (как это определено по отсутствию мембранного окрашивания PD-L1 на опухолевых клетках или иммунных клетках) при одинаковой частоте и среднем показателе по сравнению с PD-L1⁺ образцами. (фиг. 85A, 84F). На иммунных клетках 3 из 5 опухолей, в которых экспрессия PVRL2 была обнаружена на иммунных клетках, также экспрессируется PD-L1 (данные не показаны), но небольшое количество образцов затрудняет заключение про совместную экспрессию PD-L1 и PVRL2 в иммунной клетке. Экспрессия PVRL2 на опухолевых клетках в PD-L1-отрицательных опухолях продемонстрировала, что экспрессия PVRL2 была более распространенной, чем PD-L1 в некоторых типах опухолей, и что нацеливание на этот путь может быть особенно эффективным в PD-L1⁺ опухолях. В то время как PD-L1 индуцируется в первую очередь ИФН-γ в виде механизма адаптивного сопротивления (28), PVRL2 модулируется геномным стрессом, повреждением ДНК и генами-супрессорами опухолей (29, 30). Для дальнейшего понимания четкой регуляции PD-L1 и PVR/PVRL2 мы затем оценили регуляцию экспрессии PVR, PVRL2 и PD-L1 в линиях опухолевых клеток и в моноцитарных ДК путем воздействия различными воспалительными стимулами (фиг. 85D). Лечение ДК с провоспалительными сигналами обычно приводит к увеличению экспрессии PVR, PVRL2 и PD-L1, демонстрируя, что экспрессия PVR, PVRL2 и PD-L1 увеличивается после созревания ДК. В противоположность этому, лечение эпителиальными клетками с ИФН-γ повышала экспрессию PD-L1, но не имело никакого эффекта на высокую базовую экспрессию PVRL2 (фиг. 85E), поддерживая дифференциальную регуляцию экспрессии PVRL2 по сравнению с PD-L1 с помощью ИФН-γ. Таким образом, эти данные демонстрируют, что PD-L1 и PVRL2 могут быть совместно регулированы на антигенпредставляющих клетках (АПК), таких как ДК, но могут быть дифференциально регулированы на эпителиальных клетках. Наличие PVRL2- в PD-L1-отрицательных опухолей указывает на то, что нацеливание на этот путь может быть потенциально полезным у пациентов, которые не реагируют на или прогрессируют на ингибиторах PD-1.

СНА.7.518.1.H4 (S241P) представляет собой высокоаффинное гуманизированное моноклональное антитело к PVRIG, которое нарушает взаимодействие PVRIG с PVRL2.

Чтобы исследовать функциональные последствия антагонистических взаимодействий PVRIG-PVRL2 человека, мы создали высокоаффинное антагонистическое анти-PVRIG антитело, СНА.7.518.1.H4 (S241P), которое блокирует взаимодействие PVRIG и PVRL2. Это антитело избирательно связывало клетки НЕК293, эктопически экспрессирующие PVRIG человека или PVRIG яванского ма-

кака, а также связывало клетки Jurkat, которые эндогенно экспрессируют PVRIG с субнаномолярной аффинностью (фиг. 86А). В биохимических анализах CHA.7.518.1.H4 (S241P) блокировало взаимодействие PVRIG Fc с PVRL2⁺ HEK293 клетками (фиг. 86В), а также блокировало связывание PVRL2 Fc с PVRIG⁺ HEK293 клетками (фиг. 86С). Используя это антитело, мы наблюдали функциональный эффект антагонистического анти-PVRIG в нескольких анализах Т-клеток. Искусственные антигенпредставляющие клетки (аAPC), эктопически экспрессирующие антитела против CD3 клеточной поверхности и PVRL2 человека, были получены и совместно культивированы с первичными человеческими CD4 Т-клетками или в присутствии анти-PVRIG (CHA.7.518.1.H4(S241P)) или изотипического контроля. Экспрессию PVRIG индуцировали на пролиферирующих CD4-Т-клетках при совместном культивировании с CHO анти-CD3 аAPC (фиг. 94А). Антагонизм PVRIG с CHA.7.518.1.H4 (S241P) усиливал пролиферацию CD4-Т-клеток от нескольких доноров (фиг. 86D). Мы также протестировали эффект анти-PVRIG на 2 gp100-реактивных CD8 Т-клеточных линиях человека, которые были получены из опухолей меланом. Эти линии Т-клеток были по отдельности совместно культивированы с аAPC, экспрессирующими HLA-A2 и PVRL2, (фиг. 94В) в присутствии изотипического контроля IgG или анти-PVRIG антител. Как отмечено в обеих линиях, анти-PVRIG увеличивало продукцию ИФН-γ и ФНО-α на ~20-50%. В оценке дозозависимого ответа CHA.7.518.1.H4 (S241P) отображали однозначные наномолярные значения ЭК50 в нескольких анализах (фиг. 94С, D). Эти данные в совокупности демонстрируют, что антагонистические взаимодействия PVRIG-PVRL2 с CHA.7.518.1.H4 (S241P) приводили к увеличению активации Т-клеток.

CHA.7.518.1.H4 (S241P) в комбинации с ингибиторами TIGIT или PD-1 приводило к синергетическому усилению функции Т-клеток.

Комбинация блокады PVRIG и TIGIT синергетически увеличивала функцию CD4 Т-клеток в анализе совместного культивирования Т-клеток-дендритных клеток (15), что указывает на роль этого пути в регуляции взаимодействий Т-клеток-АПК. Эффекты блокады PVRIG и TIGIT на CD8 Т-клетки в условиях совместной культуры опухолевых клеток не сообщались. Поскольку наш профиль экспрессии опухоли продемонстрировал экспрессию PVRL2 на CD45- иммунных клетках, мы дополнительно изучили эффект ориентации нацеливания на этот путь в совместной культуре Т-клеток - опухолевых клеток с использованием 2 систем анализа Т-клеток. Сначала мы выполнили совместное культивирование 2 gp100-неоантигенспецифических линий CD8 Т-клеток с клеточной линией меланомы, MEL624, в присутствии анти-PVRIG, анти-TIGIT или изотипических антител, или по отдельности, или в комбинации. Клетки MEL624 экспрессируют как PVR, так и PVRL2, и TIL-209 и TIL-463 экспрессируют PVRIG, TIGIT и PD-1 (фиг. 86F). На TIL-209 мы заметили, что только анти-PVRIG или анти-TIGIT не увеличивают ИФН-γ и что комбинация анти-PVRIG и анти-TIGIT синергетически увеличивала продукцию ИФН-γ (фиг. 86G). На TIL-463 мы заметили, что анти-PVRIG или анти-TIGIT умеренно увеличивают продукцию ИФН-γ и что комбинация анти-PVRIG и анти-TIGIT аддитивно увеличивает ИФН-γ (фиг. 86G). В дополнительной аналитической системе мы использовали CMVpp65-реактивные CD8 Т-клетки в качестве модельной системы для изучения ответов Т-клеток человека. HLA-A2⁺ CMVpp65 CD8 Т-клетки размножали в присутствии CMVpp65 (495-503) и экспрессию PVRIG, TIGIT и PD-1 наблюдали на 10-е сутки (фиг. 86F). PVRIG экспрессировали на CMVpp65-специфических CD8 Т-клетках с такой же величиной, что и в образцах рака человека (фиг. 83). В качестве клеток-мишеней мы идентифицировали PD-L1^{hi} (Panc05.04) и PD-L1^{lo} (Colo205) HLA-A2⁺ линии раковых клеток, которые экспрессировали аналогичные количества PVR и PVRL2 (фиг. 86F). Затем мы провели совместное культивирование CMVpp65-реактивных Т-клеток с HLA-A2⁺ линиями опухолевых клеток, которым вводили пептид pp65 (495-503), в присутствии блокирующих антител к PVRIG, TIGIT и/или PD-1. Мы наблюдали, что анти-PVRIG Ат увеличивало ИФН-γ на ~50% в совместной культуре с клетками Panc05.04 и минимально в совместной культуре с Colo205 (фиг. 86I). Комбинация анти-TIGIT с анти-PVRIG Ат синергетически увеличивала продукцию ИФН-γ на обеих линиях клеток-мишеней, что привело к большему увеличению ИФН-γ по сравнению с только антителом к PD-1 (фиг. 86H). Комбинирование анти-PVRIG и анти-PD-1 также приводило к синергетическому увеличению продукции ИФН-γ по сравнению с отдельным антителом (фиг. 86I). В совокупности эти данные указывают на сильную синергию комбинирования блокады PVRIG и TIGIT или PVRIG и PD1 при увеличении активации человеческих CD8 Т-клеток при взаимодействии с опухолевыми клетками.

Дефицит PVRIG приводил к увеличению пролиферации Т-клеток и уменьшению роста опухоли.

Хотя последовательности для PVRIG мыши и его взаимодействия с PVRL2 мыши описаны, профиль экспрессии и иммуномодулирующая активность PVRIG мыши не хорошо изучены. Сначала мы проанализировали экспрессию РНК и транскрипт mPVRIG в NK, NKT и Т-клетках (фиг. 87А). Активированные мышинные CD8 Т-клетки имели повышенное содержание транскриптов PVRIG с задержкой кинетики индукции по сравнению с TIGIT (фиг. 87В). Мы подтвердили, что рекомбинантный mPVRIG связывался с белком mPVRL2 при помощи поверхностного плазмонного резонанса (ППР) и ИФА, который выполнялся в нескольких аналитических ориентациях (фиг. 95А-Д). Мы также наблюдали взаимодействие между mPVRIG и mPVR, хотя аффинность была примерно в 10 раз меньше, чем взаимодействие с mPVRL2 (фиг. 95Е). Для того, чтобы определить, является ли PVR или PVRL2 доминирующим ли-

гандом для mPVRIG, мы тестировали связывание мышинового PVRIG Fc с клетками B16F10, которые экспрессируют PVR и PVRL2 (данные не показаны). PVRIG Fc продемонстрировал зависимое от дозы связывание с клетками B16F10, которое было полностью отменено при нокдауне киПНК PVRL2 в клетках B16F10 (фиг. 95F). Для сравнения, связывание слитого белка PVRIG Fc не значительно, но последовательно уменьшалось после нокдауна PVR (фиг. 95F), что свидетельствует о слабом взаимодействии между mPVRIG и mPVR. Взятые вместе, эти результаты демонстрируют, что у мышей, PVRL2 является основным лигандом для PVRIG, как и в случае с человеком.

Чтобы определить роль PVRIG в иммунных ответах, мы получали дефицитных по PVRIG ($^{-/-}$) мышей (фиг. 96). PVRIG $^{-/-}$ мыши рождались при ожидаемых менделевских отношениях, не проявляли выраженного фенотипа до 10-месячного возраста, а в возрасте 8 недель имели сходную насыщенность лейкоцитами (периферическую и лимфоидную ткани) по сравнению с мышами дикого типа (фиг. 97). CD8 Т-клетки дикого типа (ДТ) и NK-клетки экспрессируют PVRIG и никакой экспрессии PVRIG не было выявлено на PVRIG $^{-/-}$ клетках (фиг. 87C). Чтобы исследовать роль PVRIG в регуляции ответов Т-клеток мыши, мы исследовали пролиферацию ДТ и PVRIG $^{-/-}$ Т-клеток в 2-х системах анализа. ДТ или PVRIG $^{-/-}$ Т-клетки активировали иммобилизованными анти-CD3 в присутствии растворимого белка PVRL2 Fc или контрольного белка Fc. Растворимый PVRL2 Fc значительно ингибировал пролиферацию CD4 $^{+}$ Т-клеток ДТ, но не пролиферацию PVRIG $^{-/-}$ CD4 $^{+}$ Т-клеток (фиг. 87D), что свидетельствует о том, что PVRIG $^{-/-}$ клетки не имеют ингибирующего сигнала. Для оценки роли PVRIG мыши в взаимодействии с CD8 $^{+}$ Т-клетками с опухолевыми клетками PVRIG $^{-/-}$ мышей скрещивали с pmel TCR трансгенными мышами, которые экспрессировали трансгенный TCR, специфический для gp10025-33 (28). Активированные PVRIG $^{-/-}$ или ДТ Pmel CD8 $^{+}$ Т-клетки были совместно культивированы с опухолевыми клетками меланомы B16-Db/gp100, которые эндогенно экспрессировали PVRL2 (данные не показаны) и оценивали активацию и эффекторную функцию. PVRIG $^{-/-}$ pmel CD8 $^{+}$ Т-клетки продемонстрировали усиленную дегрануляцию и продуцирование эффекторных цитокинов (ИФН- γ и ФНО- α) по сравнению с клетками ДТ (фиг. 87E). Эти данные указывают на то, что мышинный PVRIG ингибирует активацию и эффекторную функцию опухолеспецифических Т-клеток при совместном культивировании с PVRL2 $^{+}$ опухолевыми клетками-мишенями.

Затем мы изучили влияние дефицита PVRIG на рост опухоли в сингенной модели MC38. PVRIG $^{-/-}$ мыши показали значительно уменьшенный рост опухоли по сравнению с мышами ДТ ($p < 0,05$; фиг. 88A-B). Кроме того, блокада PD-L1, начатая на 14-е сутки, дополнительно усиливала противоопухолевые ответы и уменьшала рост опухоли у PVRIG $^{-/-}$ мышей по сравнению с мышами ДТ, получавшими лечение анти-PD-L1 ($p = 0,052$) (фиг. 88C-D). Чтобы оценить функциональные эффекты блокады PD-L1 на микроокружение опухолей PVRIG $^{-/-}$ и WT, мы собрали опухоли и дренирующие опухоль лимфатические узлы из каждой из четырех экспериментальных когорт на 18-е сутки, когда группы получали 2 дозы или изотипа, или анти-PD-L1, но не выявили различий в объеме опухолей, и выполнили проточную цитометрию на состав иммунной субпопуляции и внутриклеточных цитокинов. Миграция иммунных клеток (CD45 $^{+}$) в PVRIG $^{-/-}$ опухоли умеренно усиливалась (88% по сравнению с опухолями ДТ), как и для CD8 $^{+}$ Т-клеток (92% по сравнению с опухолями ДТ), так и для ИФН- γ -продуцирующих CD8 $^{+}$ Т-клеток (110% увеличение по сравнению с опухолями ДТ, фиг. 88E). В комбинации с блокадой PD-L1 инфильтрация CD45 $^{+}$ клеток была значительно увеличена в PVRIG $^{-/-}$ опухолях (160% относительно опухолей из мышей ДТ, получавших лечение PD-L1, $W = 0,032$, Фиг. 88F). У PVRIG $^{-/-}$ опухолей, обработанных анти-PD-L1, также было большее количество CD8 $^{+}$ Т-клеток на массу опухоли (увеличение до 252%) и CD8 $^{+}$ Т-лимфоцитов, продуцирующих ИФН- γ (297%), по сравнению с обработанными анти- PD-L1 опухолями ДТ (фиг. 88F). Мы также заметили, что PVRIG $^{-/-}$ мыши имели неизменное количество эффекторных инфильтрирующих опухоль CD4 $^{+}$ Т-клеток и Foxp3 $^{+}$ регуляторных Т-клеток независимо от блокады PD-L1 (данные не показаны). Освобождение от иммунной дисфункции в PVRIG $^{-/-}$ опухолях, особенно после блокады PD-L1, было отражено в опухоль-дренирующих лимфатических узлах, которые имели увеличенную встречаемость ИФН- γ + ФНО- α + эффекторных CD8 $^{+}$ Т-клеток по отношению к мышам ДТ, получавшим лечение анти-PD-L1, (фиг. 88G-H). В совокупности эти данные демонстрируют, что удаление PVRIG приводит к уменьшению роста опухоли, связанного с повышенным противоопухолевым иммунным ответом, в частности, в комбинации с анти-PD-L1 антителом.

Анти-mPVRIG антитело ингибирует рост опухоли в комбинации с антителом к PD-1 или дефицитом TIGIT.

После демонстрации того факта, что генетический дефицит PVRIG приводит к уменьшению роста опухоли, мы в дальнейшем стремились продемонстрировать, что опосредованное антителом ингибирование взаимодействия PVRIG-PVRL2 может улучшить противоопухолевый иммунитет, в частности, в комбинации с ингибиторами PD1 или TIGIT, как продемонстрировали наши данные *in vitro* для человека. Чтобы оценить это, мы создали высокоаффинное антагонистическое анти-mPVRIG антитело. Оценки аффинности анти-mPVRIG мкАт, определенные при помощи FACS, показали субнаномолярный Kd (0,33 нМ на HEK293 mPVRIG, 0,39 нМ на клетках D10.G4.1), аналогичный CHA.7.518.1.H4 (S241P) (фиг. 95G-H). Специфичность данного антитела была дополнительно подтверждена тем, что большая часть связывания с клетками D10.G4.1 было нарушено при нокдауне mPVRIG (фиг. 95I). Анти-mPVRIG тестировали

на нарушение взаимодействия mPVRIG-mPVRL2 путем ингибирования связывания mPVRIG Fc с B16F10 и связывание mPVRL2 Fc с mPVRIG-сверхэкспрессирующими клетками HEK293 (фиг. 89A). Полное блокирование взаимодействия PVRIG-PVRL2 при помощи анти-mPVRIG антитела наблюдали в обоих форматах анализа (фиг. 89A, Фиг. 95J), демонстрируя антагонистическое анти-mPVRIG антитело. Далее, мы тестировали *in vivo* эффективность блокады mPVRIG в сингенной модели подкожно опухоли толстой кишки CT26. Экспрессия PVRIG была увеличена на NK и Т-клетках в опухолевом микроокружении по сравнению с соответствующими субпопуляциями из селезенки или дренирующих лимфатических узлов (фиг. 89B). Лечение мышей, несущих опухоли, анти-mPVRIG блокирующим мкАт в виде монотерапии не позволило уменьшить рост опухоли (данные не показаны). Однако комбинация анти-PVRIG и анти-PD-L1 мкАт эффективно задерживала рост опухоли CT26 (фиг. 89C) и значительно увеличивала частоту выживаемости получавших лечение мышей на 40% от имеющих полный ответ на лечение (фиг. 89D). В соответствии с данными нашего анализа Т-клеток человека, эти данные демонстрируют, что комбинация ингибиторов PD-1 и PVRIG может уменьшить рост опухоли.

Мы также протестировали эффект удаления сигналов как PVRIG, так и TIGIT в регуляции противоопухолевых ответов. Для этих исследований мы тестировали эффективность анти-mPVRIG антитела у ДТ или TIGIT^{-/-} мышей, инокулированных клетками меланомы B16F10/Db-hmgrp100. Лечение мышей ДТ, несущих опухоли, анти-mPVRIG блокирующим мкАт имело незначительный эффект по сравнению с лечением изотипом (17% TGI на 11-е сутки и 8% TGI в конечной точке, 18-е сутки). Эффект делеции TIGIT на рост опухоли также был незначительным, по сравнению с контрольной группой ДТ (17% TGI на 11-е сутки и 13% TGI в конечной точке). Однако, когда делецию TIGIT комбинировали с лечением анти-PVRIG мкАт, наблюдали значительное ингибирование роста опухоли (63% на 11-е сутки и 49% TGI в конечной точке (фиг. 89E, F). В соответствии с ингибированием роста опухоли TIGIT^{-/-} мыши, получавшие лечение анти-PVRIG мкАт 407, демонстрировали повышенную выживаемость по сравнению с контрольной группой ДТ, однако в этой модели агрессивной быстрорастущей опухоли статистическая значимость достигнута не была (данные не показаны). В совокупности эти данные демонстрируют синергетическую активность ингибиторов PVRIG с ингибиторами PD1 или TIGIT и соответствуют нашим функциональным данным человека, что дает основание для клинических испытаний CNA.7.518.1.H4 (S241P) с ингибиторами PD1 или TIGIT.

Обсуждение

Несмотря на то, что антитела, нацеленные на контрольные точки иммунной Т-клетки, такие как CTLA4 и PD-1, увеличили выживаемость больных раком, большинство больных раком до сих пор не проявляют клинической пользы. Одной из возможных причин этого является наличие дополнительных регуляторов Т-клеток, которые ингибируют противоопухолевый иммунитет Т-клеток. В данном документе мы выяснили роль PVRIG в регуляции эффекторной функции Т-клеток и продемонстрировали, что антагонизм PVRIG увеличивает противоопухолевые ответы Т-клеток и уменьшает рост опухоли.

PVRIG является новым членом семейства нектинов и нектиноподобных молекул, располагая его среди нескольких известных иммунорегуляторных рецепторов в семействе. Понимание взаимодействия рецепторов внутри этого семейства имеет решающее значение для понимания актуальности и механизма действия PVRIG. Из этих рецепторов DNAM, TIGIT и CD96 наиболее тесно связаны с PVRIG с точки зрения совместного использования тех же лигандов, PVR и PVRL2. DNAM связывается как с PVR, так и с PVRL2 и подает костимулирующий сигнал на лимфоциты. Сообщается, что TIGIT связывается с PVR и слабо связывается с PVRL2. Мы не смогли обнаружить взаимодействие между TIGIT и PVRL2 с использованием ИФА или ППП (данные не показаны), что свидетельствует про то, что PVR является доминирующим лигандом для TIGIT. Используя аналогичные способы, и в последнем отчете обнаружили высокоаффинное взаимодействие между PVRL2 и PVRIG, что свидетельствует о том, что PVRIG является доминирующим ингибиторным рецептором PVRL2. Эти данные свидетельствуют о том, что TIGIT и PVRIG содержат двойные сигнальные узлы на этой оси и что блокирование обоих необходимо для максимального увеличения активации Т-клеток в этом семействе. В дополнение к взаимодействию с различными лигандами мы наблюдали, что PVRIG имеет самую высокую экспрессию на эффекторных или Т-клетках памяти, подобно PD-1, тогда как TIGIT имеет самую высокую экспрессию на регуляторных Т-клетках. Кроме того, мы наблюдали, что PVRIG проявлял позднюю индукцию после активации Т-клеток по сравнению с TIGIT. Эти данные свидетельствуют о том, что PVRIG имеет уникальную роль в этом семействе, взаимодействуя с высокой аффинностью к PVRL2 и имея дифференцированную экспрессию на клетках памяти и поздний индукционный профиль для TIGIT.

Сообщается о новой роли PVRIG в регуляции противоопухолевых Т-клеточных ответов с использованием дефицитных по PVRIG мышей и антагонистических анти-PVRIG антител. В данном документе было продемонстрировано, что мышинный PVRIG экспрессируется на Т-клетках и NK-клетках, индуцированных при активации лимфоцитов, и является самым высоким в TME по сравнению с периферическими. Кроме того, мы демонстрируем, что дефицит PVRIG привел к усилению функции Т-клеток *in vitro* и снижению роста опухоли *in-vivo*. Антагонистическое антитело к PVRIG уменьшало рост опухоли в комбинации с анти-PD-L1 или генетическим дефицитом TIGIT, демонстрируя необходимую роль PVRIG в регуляции ответов Т-клеток. Эти новые данные обеспечивают доказательство концепции *in vivo* с ис-

пользованием доклинических моделей опухолей, что выбор в качестве цели PVRIG в комбинации с антагонизмом PD1 или TIGIT является потенциальной новой терапией для лечения онкологических заболеваний.

В данном документе приведена информация о высокоаффинном антителе против PVRIG человека, которое нарушает взаимодействие PVRIG и PVRL2, которое мы тестируем в клинических испытаниях. Чтобы определить потенциальные признаки рака, которые могут информировать о выборе пациента в клинических испытаниях, мы проанализировали профиль экспрессии этой оси при онкологических заболеваниях человека с помощью FACS и ИГХ. Для PVRIG мы наблюдали, что средняя экспрессия PVRIG на CD4 и CD8 Т-клетках с помощью FACS является самой высокой в раковых опухолях эндометрия, легкого, почки и яичников, хотя эта разница не достигла статистической разницы с другими типами рака, как определено при помощи дисперсионного анализа с критерием множественных сравнений Тьюки с текущим количеством выборок. Поскольку PVRIG индуцируется при активации Т-клеток и учитывая, что большинство инфильтрирующих опухоль Т-клеток уже встречались с антигеном, возможно, не удивительно, что медиана экспрессии PVRIG была одинаковой между образцами опухолей и типами рака. Мы наблюдали, что экспрессия PVRIG коррелировала с экспрессией PD-1 и TIGIT, предполагая, что взаимодействие этих 3 ингибиторных рецепторов будет иметь важное значение для регуляции противоопухолевого ответа. В этом отчете мы наблюдали синергетическое увеличение функции Т-клеток, когда антитела к PVRIG комбинировали с антителами к TIGIT в совместной культуре опухолевых клеток и CD8 Т-клеток, лучше, чем PD-1 в комбинации с ингибиторами PVRIG или TIGIT. Эти данные, вместе с предыдущим исследованием, демонстрирующим роль PVRIG и TIGIT в регуляции взаимодействий ДК-Т-клеток, демонстрируют, что этот путь может быть задействован в регуляции взаимодействий Т-клеток-АПК и Т-клеток-опухолевых клеток и обеспечивает множество механизмов, посредством которых нацеливание на PVRIG может увеличить противоопухолевый иммунный ответ.

Поскольку экспрессия PD-L1 коррелировала с клиническим ответом на ингибиторы PD-1, мы также проанализировали экспрессию PVRL2 в опухолях с помощью FACS и ИГХ, чтобы оценить, имеют ли определенные типы рака более высокую экспрессию. Оценивая диссоциированные опухолевые клетки, мы обнаружили, что средняя экспрессия PVRL2 на макрофагах из образцов эндометрия, головы и шеи, почки, легкого и яичников была выше по сравнению с другими типами опухолей. Средняя экспрессия PVRL2 на CD45-неиммунных клетках была выше при онкологических заболеваниях молочной железы, толстой кишки, эндометрия, легкого, яичников и предстательной железы по сравнению с другими онкологическими заболеваниями. Основываясь на экспрессии PVRIG и PVRL2, мы определили, что онкологические заболевания эндометрия, головы и шеи, легкого, почки и яичников имеют больший риск возникновения опухолей с высокой экспрессией PVRIG и PVRL2 и что это потенциальные онкологические заболевания, которые могут реагировать на ингибиторы этого пути.

В данном документе было отмечено, что экспрессию PVRL2 можно модулировать на клетках, продуцирующих антиген, *in vitro*, медиаторами воспаления, тогда как экспрессия PVRL2 на раковых клетках не изменялась. Эти данные демонстрируют, что экспрессия PVRL2 на антигенпредставляющих клетках может регулироваться воспалением и может быть показателем воспаленной опухоли. Действительно, мы наблюдали, что все PD-L1+ опухоли также экспрессируют PVRL2 как на опухолевых клетках, так и в компартменте иммунной системы. Экспрессия PVRL2 на миелоидных клетках может помочь спрогнозировать ответы на ингибиторы PVRIG в комбинации с PD-1 или TIGIT для дальнейшего усиления противоопухолевого эффекта. Интересно, что часть PD-L1-негативных опухолей также экспрессировала PVRL2, в первую очередь, на опухолевых клетках, а не на иммунных клетках. Сообщается, что экспрессия PVR и PVRL2 на эпителиальных клетках индуцируется при опухолеобразовании, а также в ответ на стресс и повреждение ДНК. Эти данные согласуются с выводами *in vitro* о том, что регуляция экспрессии PVRL2 на опухолевых клетках не зависит от ИФН-гамма. Поскольку PD-L1 индуцируется в адаптивной резистентности в ответ на ИФН-гамма и связан с воспалительной реакцией, экспрессия PVRL2 в отсутствие PD-L1 предполагает, что экспрессия PVRL2 более распространена, чем PD-L1, и что PVRL2 экспрессируется в невоспаленных опухолях. Исходя из вышесказанного, возможно, что присутствие PVR и PVRL2 способствует подавлению иммунных ответов независимо от PD-L1 и что ингибиторы PVRIG и TIGIT могут иметь особое значение для пациентов, которые являются негативными по PD-L1 или не реагируют/прогрессируют на ингибиторах PD-1.

Таким образом, данный отчет обеспечивает несколько новых взглядов о биологии PVRIG, в том числе характеристики экспрессии этой оси при онкологических заболеваниях человека, демонстрируя важную роль PVRIG/TIGIT в регуляции взаимодействия CD8-опухолевых клеток и демонстрируя то, что антагонизм PVRIG в комбинации с PD -1 или дефицитом TIGIT приводят к синергетическому снижению роста опухоли. Эти данные расширяют наше современное понимание биологии PVRIG и обеспечивают обоснование клинического тестирования CHA.7.518.1.H4 (S241P), высокоаффинного анти- PVRIG антитела, у пациентов с раком.

Список литературы

1. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* **2000**;100(1):57-70.
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **2011**;144(5):646-74 doi 10.1016/j.cell.2011.02.013.
3. Galon J, Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, Berger A, Lagorce C, *et al.* Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours. *J Pathol* **2014**;232(2):199-209 doi 10.1002/path.4287.
4. Zitvogel L, Galluzzi L, Smyth MJ, Kroemer G. Mechanism of action of conventional and targeted anticancer therapies: reinstating immunosurveillance. *Immunity* **2013**;39(1):74-88 doi 10.1016/j.immuni.2013.06.014.
5. Danilova L, Wang H, Sunshine J, Kaunitz GJ, Cottrell TR, Xu H, *et al.* Association of PD-1/PD-L axis expression with cytolytic activity, mutational load, and prognosis in melanoma and other solid tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2016**;113(48):E7769-E77 doi 10.1073/pnas.1607836113.
6. Topalian SL, Taube JM, Anders RA, Pardoll DM. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **2016**;16(5):275-87 doi 10.1038/nrc.2016.36.
7. Zarour HM. Reversing T-cell Dysfunction and Exhaustion in Cancer. *Clin Cancer Res* **2016**;22(8):1856-64 doi 10.1158/1078-0432.CCR-15-1849.
8. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* **2012**;12(4):252-64 doi 10.1038/nrc3239.
9. Sharma P, Allison JP. Immune checkpoint targeting in cancer therapy: toward combination strategies with curative potential. *Cell* **2015**;161(2):205-14 doi 10.1016/j.cell.2015.03.030.
10. Cha E, Klinger M, Hou Y, Cummings C, Ribas A, Faham M, *et al.* Improved survival with T cell clonotype stability after anti-CTLA-4 treatment in cancer patients. *Sci Transl Med* **2014**;6(238):238ra70 doi 10.1126/scitranslmed.3008211.
11. Robert L, Tsoi J, Wang X, Emerson R, Homet B, Chodon T, *et al.* CTLA4 blockade broadens the peripheral T-cell receptor repertoire. *Clin Cancer Res* **2014**;20(9):2424-32 doi 10.1158/1078-0432.CCR-13-2648.
12. Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJ, Robert L, *et al.* PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* **2014**;515(7528):568-71 doi 10.1038/nature13954.

13. Chan CJ, Andrews DM, Smyth MJ. Receptors that interact with nectin and nectin-like proteins in the immunosurveillance and immunotherapy of cancer. *Curr Opin Immunol* **2012**;24(2):246-51 doi 10.1016/j.coi.2012.01.009.
14. Martinet L, Smyth MJ. Balancing natural killer cell activation through paired receptors. *Nat Rev Immunol* **2015**;15(4):243-54 doi 10.1038/nri3799.
15. Zhu Y, Panizza A, Schlick AC, Chen W, Koenig MR, Byers JT, *et al.* Identification of CD112R as a novel checkpoint for human T cells. *J Exp Med* **2016**;213(2):167-76 doi 10.1084/jem.20150785.
16. Bottino C, Castriconi R, Pende D, Rivera P, Nanni M, Carnemolla B, *et al.* Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *J Exp Med* **2003**;198(4):557-67 doi 10.1084/jem.20030788.
17. Yu X, Harden K, Gonzalez LC, Francesco M, Chiang E, Irving B, *et al.* The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nat Immunol* **2009**;10(1):48-57 doi 10.1038/ni.1674.
18. Stanitsky N, Simic H, Arapovic J, Toporik A, Levy O, Novik A, *et al.* The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**;106(42):17858-63 doi 10.1073/pnas.0903474106.
19. Johnston RJ, Comps-Agrar L, Hackney J, Yu X, Huseni M, Yang Y, *et al.* The immunoreceptor TIGIT regulates antitumor and antiviral CD8(+) T cell effector function. *Cancer Cell* **2014**;26(6):923-37 doi 10.1016/j.ccell.2014.10.018.
20. Zhang B, Zhao W, Li H, Chen Y, Tian H, Li L, *et al.* Immunoreceptor TIGIT inhibits the cytotoxicity of human cytokine-induced killer cells by interacting with CD155. *Cancer Immunol Immunother* **2016**;65(3):305-14 doi 10.1007/s00262-016-1799-4.
21. Chan CJ, Martinet L, Gilfillan S, Souza-Fonseca-Guimaraes F, Chow MT, Town L, *et al.* The receptors CD96 and CD226 oppose each other in the regulation of natural killer cell functions. *Nat Immunol* **2014**;15(5):431-8 doi 10.1038/ni.2850.
22. Fuchs A, Cella M, Giuriso E, Shaw AS, Colonna M. Cutting edge: CD96 (tactile) promotes NK cell-target cell adhesion by interacting with the poliovirus receptor (CD155). *J Immunol* **2004**;172(7):3994-8.
23. Machlenkin A, Uzana R, Frankenburg S, Eisenberg G, Eisenbach L, Pitcovski J, *et al.* Capture of tumor cell membranes by trogocytosis facilitates detection and isolation of tumor-specific functional CTLs. *Cancer Res* **2008**;68(6):2006-13 doi 10.1158/0008-5472.CAN-07-3119.
24. Ohtani H, Nakajima T, Akari H, Ishida T, Kimura A. Molecular evolution of immunoglobulin superfamily genes in primates. *Immunogenetics* **2011**;63(7):417-28 doi 10.1007/s00251-011-0519-7.
25. Taube JM, Anders RA, Young GD, Xu H, Sharma R, McMiller TL, *et al.* Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med* **2012**;4(127):127ra37 doi 10.1126/scitranslmed.3003689.
26. Cerboni C, Fionda C, Soriani A, Zingoni A, Doria M, Cippitelli M, *et al.* The DNA Damage Response: A Common Pathway in the Regulation of NKG2D and DNAM-1 Ligand Expression in Normal, Infected, and Cancer Cells. *Front Immunol* **2014**;4:508 doi 10.3389/fimmu.2013.00508.
27. de Andrade LF, Smyth MJ, Martinet L. DNAM-1 control of natural killer cells functions through nectin and nectin-like proteins. *Immunol Cell Biol* **2014**;92(3):237-44 doi 10.1038/icb.2013.95.
28. Overwijk WW, Tsung A, Irvine KR, Parkhurst MR, Goletz TJ, Tsung K, *et al.* gp100/pmel 17 is a murine tumor rejection antigen: induction of «self»-reactive, tumoricidal T cells using high-affinity, altered peptide ligand. *J Exp Med* **1998**;188(2):277-86.

S. Пример 19: Анализ уничтожения опухолей клеток

Эффект антитела против TIGIT человека и CHA.7.518.1.H4 (S241P), как по отдельности, так и в комбинации, на уничтожение опухолевых клеток оценивали с помощью анализа совместной культуры *in vitro* с человеческими ЦМВ-специфическими CD8⁺ Т-клетками. Линии HLA-A2⁺ целевых клеток, ис-

пользуемые в анализе, представляли собой клеточную линию меланомы Mel624, которая стабильно экспрессирует PVR и PVRL2 человека, а также клеточную линию аденокарциномы поджелудочной железы Рапс05.04, которая экспрессирует эндогенные уровни PVR и PVRL2 человека. Обе линии опухолевых клеток стабильно трансдуцировали репортерным геном люциферазы посредством лентивирусной трансдукции (System Biosciences). В клетки Mel624 и Рапс05.04 вводили пептид ЦМВ pp65 при 0,0033 мкг/мл или 0,01 мкг/мл при 37°C в течение 1 ч соответственно. Клетки затем промывали и высевали по 20000 клеток/лунку. Эталонные антитела против TIGIT человека и СНА.7.518.1.Н4 (S241P) были добавлены к культуре в комбинации или с контрольным изотипическим антителом hIgG4 при 10 мкг/мл. Человеческие ЦМВ-специфические CD8⁺ Т-клетки от трех разных доноров, указанных как донор 4, донор 72 и донор 234, добавляли по 100000 клеток/лунку. Совместные культуры инкубировали при 37°C в течение 16 ч. После инкубации планшеты удаляли из инкубатора и позволяли уравниваться до комнатной температуры в течение 30 мин. В каждую лунку добавляли люциферазный субстрат Bio-Glo (Promega) и смесь уравнивали в течение 10 мин при комнатной температуре, защищенной от света. Люминесценцию или относительные световые единицы (ОСЕ) определяли количественно на многоканальном ридере EnVision (Perkin Elmer) с ультрачувствительным люминесцентным детектором. Процент специфического уничтожения рассчитывали по [(ОСЕ для лечения антител - ОСЕ только для среды)/ОСЕ только для среды] × 100.

Результаты

На фиг. 99А и В изображен эффект лечения анти-TIGIT антителом и СНА.7.518.1.Н4 (S241P) на уничтожение клеток Mel624 и Рапс05.04 соответственно. При добавлении отдельно к совместной культуре как анти-TIGIT антитело, так и СНА.7.518.1.Н4 (S241P) индуцировали значительное уничтожение Т-клетками линий опухолевых клеток по сравнению с изотипическим контрольным антителом. Для анти-TIGIT антител процент специфического уничтожения варьировался от 19 до 41% для клеток Mel624 и от 3 до 44% для клеток Рапс05.04 между тремя различными тестируемыми ЦМВ-реактивными донорами. Для СНА.7.518.1.Н4 (S241P) процент специфического уничтожения варьировался от 16 до 20% для клеток Mel624 и от 0,21 до 29% для клеток Рапс05.04. В некоторых случаях аддитивный эффект на уничтожение опухолевых клеток наблюдали при комбинированной терапии анти-TIGIT антителом и СНА.7.518.1.Н4(S241P).

Чтобы определить, был ли эффект анти-TIGIT антитела и СНА.7.518.1.Н4 (S241P) на уничтожение опухолевых клеток зависимым от дозы, анализ проводили с использованием 10-точечных, 2-кратных серий разведений для каждого антитела, начиная с 0,5 мкг/мл для анти-TIGIT антител, и 10 мкг/мл для СНА.7.518.1.Н4 (S241P) (фиг. 100). Гибель Mel624 уменьшалась дозозависимым образом, когда или анти-TIGIT антитело, BM26, или CPA.9.086, комбинировали с СНА.7.518.1.Н4 (S241P). Более сильное уничтожение наблюдали для комбинации CPA.9.086 и СНА.7.518.1.Н4(S241P) с ЭК₅₀ 0,40 ± 0,49 нМ по сравнению с комбинацией BM26 и СНА.7.518.1.Н4(S241P) с ЭК₅₀ 2,6 ± 1,7 нМ.

Т. Пример 20: Биофизическое измерение K_D

Равновесные эксперименты KinExA (анализ кинетического исключения) проводили с использованием прибора KinExA 3200 (Sapidyne Instruments, Бойсе, Айдахо, США) при 22°C. Реконбинантный His-меченый человеческий TIGIT был получен от Sino Biologicals (Пекин, Китай) и восстановлен в 1XPBS. Все образцы антигена и антитела для анализа KinExA были приготовлены в дегазированном буфере PBST (PBS с 0,05% твин 20) с 100 мкг/мл фильтрованного BSA и 0,02% азида натрия. Используемое вторичное детектирующее антитело представляло собой меченый Alexa Flour 647 козий античеловеческий IgG (H + L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories), разведенный в 400-700 раз в буфере PBST (с BSA и азидом), описанным выше, из 0,5 мг/мл в IX PBS, pH 7,4. Для каждого эксперимента KinExA ~ 20 мкг человеческого TIGIT разбавляли в 1 мл 50 мМ карбоната натрия, pH 9,2, который добавляли непосредственно к 50 мг гранул азлактона (Ultralink Support, Thermo Scientific, Рокфорд, Иллинойс, США) и перемешивали в течение ночи при 4 °C. После перемешивания гранулы промывали один раз 1 М Трис-буфером, pH 8,5, содержащим 10 мг/мл BSA и перемешивали в течение одного часа при комнатной температуре в том же буфере. Сшитые гранулы добавляли в кювету для гранул в приборе KinExA и разбавляли до ~ 30 мл IX HBS-N (0,01 М Hepes, 0,15 М NaCl, GE Healthcare), содержащим 0,02% азида натрия, который также был подвижным буфером для прибора KinExA. Все антигенсвязанные гранулы использовали сразу же после приготовления.

Для двух повторных измерений K_d для CPA.9.086 (табл. 1) 14 концентраций TIGIT в диапазоне от 957 аМ до 212 пМ были уравновешены при комнатной температуре в течение 72 ч при помощи 2,5 пМ сайтов связывания CPA.9.086 и 1,8 пМ сайтов связывания CPA.9.086. Для CPA.9.083 14 концентраций TIGIT в диапазоне от 478 аМ до 196 пМ были уравновешены в течение ~ 72 ч при помощи 1,8 пМ сайтов связывания CPA.9.083. Для повторных измерений эталонного антитела BM26 hIgG4, 14 концентраций TIGIT в диапазоне от 9,6 фМ до 3,53 нМ были уравновешены в течение ~ 72 ч при помощи 20 пМ сайтов связывания BM26 и 8,0 пМ сайтов связывания BM26. Для СНА.9.547.13 14 концентраций TIGIT в диапазоне от 10,5 фМ до 2,2 нМ были уравновешены в течение ~72 ч при помощи 8 пМ сайтов связывания мкАт СНА.9.547.13. Объем, протекающий через пакет гранул для каждого уравновешенного образца для

всех экспериментов, составлял от 4 до 11 мл при скорости потока 0,25 мл/мин. Данные соответствовали модели связывания "стандартного равновесия" 1:1с использованием программного обеспечения KinExA Pro (версия 4.2.10, Sapidyne Instruments) для оценки K_d и получения 95%-ного доверительного интервала (ДИ) сглаженной кривой.

Результаты

Как CPA.9.083, так и CPA.9.086 связаны с человеческим TIGIT с фемтомолярной аффинностью связывания, тогда как CNA.9.547.13 и BM26 связаны с пикомолярной аффинностью. Таким образом, CPA.9.083 и CPA.9.086 связаны с человеческим TIGIT с наивысшей аффинностью из четырех различных тестируемых антител.

Таблица 1. Измерения K_D антител hIgG4 против TIGIT человека, определенных при помощи KinExA

Антитело	$K_D \pm 95\% \text{ ДИ (n = 1)}$	$K_D \pm 95\% \text{ ДИ (n = 2)}$
CNA.9.547.13	$18,8 \pm 5,8 \text{ пМ}$	Не определено
CPA.9.083	$694 \pm 277 \text{ фМ}$	Не определено
CPA.9.086	$553 \pm 230 \text{ фМ}$	$665 \pm 378 \text{ фМ}$
BM26	$8,2 \pm 2,8 \text{ пМ}$	$11,2 \pm 3,6 \text{ пМ}$

U. Пример 21: Разработка и функциональная характеристика CPA.9.086, нового терапевтического антитела, направленного на иммунную контрольную точку TIGIT

Уровень техники: TIGIT является коингибиторным рецептором, который высоко экспрессируется на лимфоцитах, включая эффекторные и регуляторные CD4⁺ Т-клетки (Treg), эффекторные CD8⁺ Т-клетки и NK-клетки, которые проникают в различные типы опухолей. Вовлечение TIGIT с его известными лигандами, рецепторами полиовируса (PVR) и PVR-подобными белками (PVRL2 и PVRL3) непосредственно подавляет активацию лимфоцитов. PVR также широко экспрессируется в опухолях, что указывает на то, что сигнальная ось TIGIT-PVR может быть доминирующим механизмом ускользания от иммунологического надзора для рака. Мы сообщаем в данном документе о биофизической и функциональной характеристике CPA.9.086, терапевтического антитела, нацеленного на TIGIT. Мы также демонстрируем, что совместная блокада TIGIT и новый ингибитор контрольных точек PVRIG увеличивает ответы Т-клеток.

Материалы и методы: для выявления терапевтических анти-TIGIT антител проводились кампании фагового дисплея человека и гибридной технологии антител мыши. Полученные антитела оценивали на их способность связываться с рекомбинантным и экспрессированным на клеточной поверхности TIGIT человека с высокой аффинностью. Также была исследована перекрестная реактивность антител к TIGIT яванского макака и мыши. Субпопуляции антител, которые связывались с высокой аффинностью с TIGIT человека, и имели перекрестную реактивность с TIGIT яванского макака, были дополнительно охарактеризованы по их способности блокировать взаимодействие между TIGIT и PVR. Блокирующие антитела подвергали скринингу на их способность повышать антигенспецифическую активацию Т-клеток *in vitro* или отдельно, или в комбинации с анти-PVRIG антителом, CNA.7.518.1.H4(S241P).

Результаты: было идентифицировано главное антитело, CPA.9.086, которое связывается с человеческим TIGIT с высокой фемтомолярной аффинностью. Это антитело, связанное с TIGIT, эндогенно экспрессируемое на человеческих CD8⁺ Т-клетках с более высокой аффинностью, чем протестированные эталонные антитела, а также было перекрестно-реактивным для TIGIT, как яванского макака, так и мыши. Когда тестировали на активность *in vitro*, CPA.9.086 увеличивало секрецию цитокинов и уничтожение опухолевых клеток ЦМВ-специфическими CD8⁺ Т-клетками с превосходной или эквивалентной активностью к протестированным эталонным антителам. Комбинация CPA.9.086 с анти-PD1 антителом или CNA.7.518.1.H4(S241P) приводила к усилению ЦМВ-специфической активности CD8⁺ Т-клеток. Кроме того, мы продемонстрировали, что TIGIT преимущественно экспрессируется на Treg и эффекторных CD8⁺ Т-клетках из солидных опухолей по сравнению с периферической кровью, что указывает на то, что эти популяции, вероятно, будут преимущественно нацелены CPA.9.086.

Закключение: Описана разработка антагонистического антитела к TIGIT с очень высокой аффинностью, CPA.9.086, которое в данное время находится в доклинической разработке. Мы постулируем, что фемтомолярная аффинность CPA.9.086 может приводить к снижению и меньшей частоте введения дозы у пациентов. CPA.9.086 может усилить активацию Т-клеток человека или отдельно, или в комбинации с другими антителами к контрольным точкам. Таким образом, эти данные демонстрируют полезность нацеливания на TIGIT, PD1 и PVRIG для лечения рака.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для лечения рака путем активации Т-клеток и/или NK-клеток, содержащая антиген-связывающий домен, который связывается с TIGIT человека (SEQ ID NO: 97), содержащая:

- а) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 160; и
- б) вариабельный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 165,

где композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

2. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что указанная композиция представляет собой антитело, содержащее:

а) тяжелую цепь, содержащую VH-CH1-шарнир-CH2-CH3, при этом указанный VH содержит SEQ ID NO: 160; и

б) легкую цепь, содержащую VL-VC, при этом указанный VL содержит SEQ ID NO: 165 и VC представляет собой или каппа, или лямбда.

3. Композиция по п.2, отличающаяся тем, что последовательность указанного CH1-шарнир-CH2-CH3 выбирают из IgG1, IgG2 и IgG4 человека и их вариантов.

4. Композиция по п.2 или 3, отличающаяся тем, что указанная тяжелая цепь имеет SEQ ID NO: 164 и указанная легкая цепь имеет SEQ ID NO: 169.

5. Композиция по любому из пп.2-4, дополнительно содержащая второе антитело, которое связывается с рецепторным белком контрольной точки человека.

6. Композиция по п.5, отличающаяся тем, что указанное второе антитело связывает PD-1 человека.

7. Композиция по п.5, отличающаяся тем, что указанное второе антитело связывает PVRIG человека (SEQ ID NO: 2).

8. Композиция по п.7, отличающаяся тем, что указанное второе антитело содержит антигенсвязывающий домен, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 5, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 10.

9. Композиция по п.7, отличающаяся тем, что тяжелая цепь указанного второго антитела имеет SEQ ID NO: 9, и легкая цепь указанного второго антитела имеет SEQ ID NO: 14.

10. Композиция нуклеиновых кислот для лечения рака путем активации Т-клеток и/или НК-клеток, содержащая:

а) первую нуклеиновую кислоту, кодирующую вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий SEQ ID NO: 160; и

б) вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую вариабельный домен легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 165.

11. Композиция нуклеиновых кислот по п.10, отличающаяся тем, что указанная первая нуклеиновая кислота кодирует тяжелую цепь, содержащую VH-CH1-шарнир-CH2-CH3, при этом указанный VH содержит SEQ ID NO: 160; и указанная вторая нуклеиновая кислота кодирует легкую цепь, содержащую VL-VC, при этом указанный VL, содержащий SEQ ID NO: 165, и VC представляет собой домен лямбда.

12. Композиция векторов экспрессии для лечения рака путем активации Т-клеток и/или НК-клеток, содержащая первый вектор экспрессии, содержащий указанную первую нуклеиновую кислоту по п.10 или 11, и второй вектор экспрессии, содержащий указанную вторую нуклеиновую кислоту по п.10 или 11 соответственно.

13. Композиция векторов экспрессии для лечения рака путем активации Т-клеток и/или НК-клеток, содержащая вектор экспрессии, содержащий указанную первую нуклеиновую кислоту по п.10 или 11 и указанную вторую нуклеиновую кислоту по п.10 или 11 соответственно, где композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

14. Клетка-хозяин, содержащая указанную композицию векторов экспрессии по п.12 или 13.

15. Способ получения анти-TIGIT антитела, включающий:

а) культивирование указанной клетки-хозяина по п.14 в условиях, когда указанное антитело экспрессируется; и

б) выделение указанного антитела.

16. Способ лечения рака путем активации Т-клеток, включающий введение композиции по любому из пп.1-9.

PVRIG человека, ДТ, полноразмерный

Последовательность PVRIG человека, которая начинается с положения 21- альтернативный метионин

MGHRTLVLPPWVLLTLCVTAGTPEVWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTWSWGGPAGGTTLAVLHPERGIR
QWAPARQARWETQSSISLILEGSGASSPCANTTFCCKFASFPEGSWEACGSLPPSSDPGLSAPPTPAPILRADLAGILGV
SGVLLFGCVYLLHLRRHKHRPAPRLQPSRTSPQAPRARAWAPSQA

(SEQ ID NO: 1)

Последовательность PVRIG человека, которая начинается с положения 1, метионина

MRTEAQVLPQPPLEGAMGHRTLVLPPWVLLTLCVTAGTPEVWVQVRMEATELSSFTIRCGFLGSGSISLVTWSWG
GPNGAGGTTLAVLHPERGIRQWAPARQARWETQSSISLILEGSGASSPCANTTFCCKFASFPEGSWEACGSLPPSSDPGL
LSAPPTPAPILRADLAGILGVSGVLLFGCVYLLHLRRHKHRPAPRLQPSRTSPQAPRARAWAPSQA

(SEQ ID NO:2)

Фиг. 1

Альфа изоформа PVLR2 человека

>gi|5360210|ref|NP_002847.1| предшественник альфа изоформы нектин-2 [Homo sapiens]
 MARAAALLPSRSPTPLLLWPLLLLLLLETGAQDVRVQVLEVRGQLGGTVLPCHELLPFVPGLYISLVTV
 QRPDAPANHQNVAAFHFKMGPSFFSPKPSERLSFVSAKQSTGQDTEAELQDATLALHGLTVEDEGNYTC
 EFATFPKGSVRGMTWLRVIAKPKNQAEAAQKVTFSQDPTTVALCISKGRPPARISWLSSLDWEAKETQVS
 GTLAGTVTVTSRFTLVPSGRADGVETCKVHEHSFEFPALIPVTLVRYPPFVSLSGYDDNWYLGRTDAT
 LSCDVRSNPEPTGYDWSFTTSGTFPTSAVAQGSQLVIAVDLSLNTTFTVCTVTNAVGMGRAEQVIFVRETP
 RASPRDVGPLYWGAVGGLLVLLVLLAGGSLAFLILEVFRFRKSPGGAGGGASGCGGFYDPAQVILNGNDP
 VFWTVPVPGPMEPDGGKDEEEEEEEKASKGLMLPPPPALEDDMESQLDGSLSIRRAVYV

(SEQ ID NO:3)

Дельта изоформа PVLR2 человека

>gi|112789532|ref|NP_001036189.1| предшественник дельта изоформы нектин-2 [Homo sapiens]
 MARAAALLPSRSPTPLLLWPLLLLLLLETGAQDVRVQVLEVRGQLGGTVLPCHELLPFVPGLYISLVTV
 QRPDAPANHQNVAAFHFKMGPSFFSPKPSERLSFVSAKQSTGQDTEAELQDATLALHGLTVEDEGNYTC
 EFATFPKGSVRGMTWLRVIAKPKNQAEAAQKVTFSQDPTTVALCISKGRPPARISWLSSLDWEAKETQVS
 GTLAGTVTVTSRFTLVPSGRADGVETCKVHEHSFEFPALIPVTLVRYPPFVSLSGYDDNWYLGRTDAT
 LSCDVRSNPEPTGYDWSFTTSGTFPTSAVAQGSQLVIAVDLSLNTTFTVCTVTNAVGMGRAEQVIFVRETP
 NTAGAGATCGGIGGIIAALLATAVAATGIIICRQQRKEQTLQGAEEDEDLGGPFSYKPPTPKAKLEAQEM
 PSQLFTLGASEHSPKTPYFDAGASCTRQEMPRYHELFTEERSGPIHFGATSLGSPIPVFPGPFAVEDV
 SLDEDEEGEEEEYLDKINPIYDALSY

(SEQ ID NO:4)

Фиг. 2

CHA.7.518.1.H4(S241P)

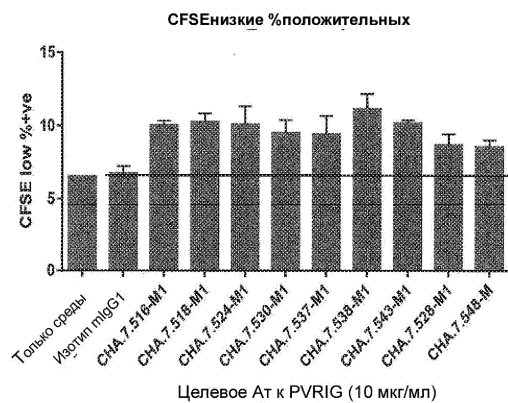
Что именно	Последовательность	SEQ ID NO:
Варибельный домен тяжелой цепи (vh)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGSGGYAQKFQGRVTMTDSTSTVYME LSSLRSEDVAVYCAREDKTARNAMDYWGQGLTVTVSS	5
vhCDR1	GYTFTDYN	6
vhCDR2	IYPYIGGS	7
vhCDR3	AREDKTARNAMDY	8
Полноразмерная HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGSGGYAQKFQGRVTMTDSTSTVYME LSSLRSEDVAVYCAREDKTARNAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTITYCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPAPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTSKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSYMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	9
Варибельный домен легкой цепи (vl)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QHFWGTPYTFGQGTKLEIK	10
vlCDR1	ENIYSN	11
vlCDR2	EAT	12
vlCDR3	QHFWGTPYT	13
Полноразмерная легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QHFWGTPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSY SLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC	14

Фиг. 3А

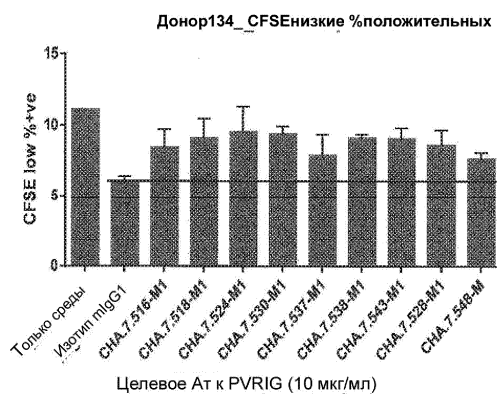
CHA.7.538.1.2.H4(S241P)

Что именно	Последовательность	SEQ ID NO:
Варибельный домен тяжелой цепи (vh)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYAFTNYLIEWVRQAPGQGLEWIGVINPGSGGIYYAQKFQGRVTMTADTSTSTVYME LSSLRSEDVAVYCARSETHDTWFAYWGQGLTVTVSS	15
vhCDR1	GYAFTNYL	16
vhCDR2	INPGSGGI	17
vhCDR3	ARSETHDTWFAY	18
Полноразмерная HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYAFTNYLIEWVRQAPGQGLEWIGVINPGSGGIYYAQKFQGRVTMTADTSTSTVYME LSSLRSEDVAVYCARSETHDTWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALT GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTITYCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPAPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTSKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF FSCSYMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	19
Варибельный домен легкой цепи (vl)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVRIAFAVWFQQKPGKAPKALILASTRHTGVPFRFSGSGSGTDFTLTISVQPEDFATY YCLQHWNYPYTFGQGTKLEIK	20
vlCDR1	QSVRIA	21
vlCDR2	LAS	22
vlCDR3	LQHWNYPYT	23
Полноразмерная легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVRIAFAVWFQQKPGKAPKALILASTRHTGVPFRFSGSGSGTDFTLTISVQPEDFATY YCLQHWNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSY SLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC	24

Фиг. 3В



Фиг. 4А



Фиг. 4В

Антитело (mIgG)	ЭК ₅₀ (НЕК ОЕ, нМ)	НЕК ОЕ/par (3,3 мкг/мл, gMFIr)	Jurkat (3,3 мкг/мл, gMFIr)
CHA.7.502	40.18	71.99	6.21
CHA.7.503	1.05	260.98	23.59
CHA.7.506	Нет связывания	0.76	Нет связывания
CHA.7.508	3.30	45.86	6.50
CHA.7.510	92.81	16.32	4.19
CHA.7.512	52.99	5.12	1.47
CHA.7.514	5.31	49.82	7.67
CHA.7.516	0.79	37.90	5.73
CHA.7.518	0.36	42.24	6.58
CHA.7.520	Нет связывания	1.01	Нет связывания
CHA.7.522	91.44	10.12	2.99
CHA.7.524	0.46	48.33	7.87
CHA.7.525	3.05	41.86	4.30
CHA.7.526	2.99	47.28	3.98
CHA.7.527	Нет связывания	0.98	Нет связывания
CHA.7.528	7.31	44.88	6.17
CHA.7.530	0.33	51.14	8.04
CHA.7.534	1.87	43.72	5.05
CHA.7.535	3.67	40.44	2.79
CHA.7.537	2.47	36.61	5.53

Фиг. 5А

CHA.7.538	0.52	35.80	7.37
CHA.7.543	0.52	49.81	6.73
CHA.7.544	0.76	42.60	5.68
CHA.7.545	0.76	44.31	6.53
CHA.7.546	0.61	43.14	6.42
CHA.7.547	14.37	10.94	1.02
CHA.7.548	0.27	45.26	7.37
CHA.7.549	2.60	29.71	2.23
CHA.7.550	1.34	27.72	2.10

Фиг. 5В

Антитело (mgG)	CD56 int NK человека (gMFIr, 10 мкг/мл)	CD8+ Т-клетки человека (gMFIr, 10 мкг/мл)	Ехр1 ОЕ/par яванського макака (gMFIr, 3,3 мкг/мл)	НК-клетки яванського макака (gMFIr, 10 мкг/мл)	CD8+ Т-клетки яванського макака (gMFIr, 10 мкг/мл)
CHA.7.502	1.97	1.41	60.49	Не тестировали	Не тестировали
CHA.7.503	3.15	1.96	106.3	Не тестировали	Не тестировали
CHA.7.506	Не тестировали	Не тестировали	0.77	Не тестировали	Не тестировали
CHA.7.508	3.6	4.09	41.49	Не тестировали	Не тестировали
CHA.7.510	3.13	2.73	38.21	Не тестировали	Не тестировали
CHA.7.512	1.30	1.15	8.96	Не тестировали	Не тестировали
CHA.7.514	4.16	5.15	65.20	Не тестировали	Не тестировали
CHA.7.516	4.22	4.09	60.05	1.76	2.09
CHA.7.518	5.08	6.69	83.51	1.92	2.09
CHA.7.520	1.13	1.04	Не тестировали	Не тестировали	Не тестировали
CHA.7.522	2.06	1.90	27.24	Не тестировали	Не тестировали

Фиг. 6А

CHA.7.524	5.50	6.12	66.32	1.78	2.02
CHA.7.525	1.98	1.76	0.85	Не тестировали	Не тестировали
CHA.7.526	2.08	1.71	0.79	Не тестировали	Не тестировали
CHA.7.527	1.16	0.99	Не тестировали	Не тестировали	Не тестировали
CHA.7.528	3.08	3.63	12.2	1.21	1.18
CHA.7.530	6.04	6.47	60.80	1.73	1.89
CHA.7.534	2.60	1.96	46.27	Не тестировали	Не тестировали
CHA.7.535	2.24	1.28	0.82	Не тестировали	Не тестировали
CHA.7.537	3.90	3.41	1.55	1.18	1.19
CHA.7.538	6.49	6.17	15.16	1.36	1.45
CHA.7.543	4.48	4.33	0.83	1.35	1.39
CHA.7.544	2.36	2.54	61.09	Не тестировали	Не тестировали
CHA.7.545	2.54	2.82	0.91	Не тестировали	Не тестировали
CHA.7.546	2.75	2.95	0.85	Не тестировали	Не тестировали
CHA.7.547	2.21	1.13	26.65	Не тестировали	Не тестировали
CHA.7.548	3.15	3.35	4.25	1.18	1.09
CHA.7.549	3.05	1.42	1.00	Не тестировали	Не тестировали
CHA.7.550	1.60	1.29	0.90	Не тестировали	Не тестировали

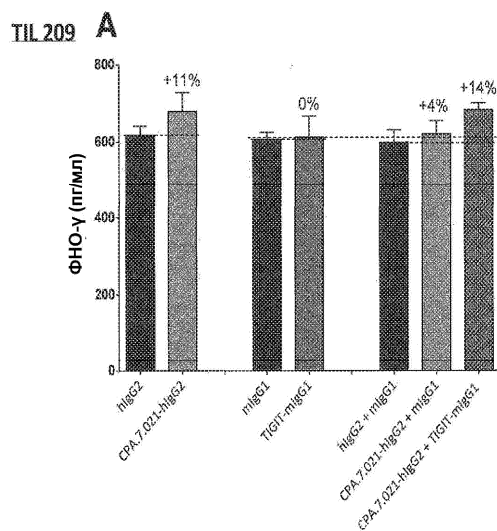
Фиг. 6В

Антитело (mIgG)	ИК50 (нМ)
CHA.7.502	39.90
CHA.7.503	Без ИК ₅₀
CHA.7.506	31.65
CHA.7.508	37.88
CHA.7.510	55.00
CHA.7.512	839.6
CHA.7.514	38.88
CHA.7.516	33.11
CHA.7.518	23.15
CHA.7.520	619.3
CHA.7.522	50.48
CHA.7.524	30.20
CHA.7.525	85.52
CHA.7.526	58.88
CHA.7.527	Без ИК ₅₀
CHA.7.528	28.88
CHA.7.530	34.56
CHA.7.534	181.4
CHA.7.535	821.1
CHA.7.537	38.95
CHA.7.538	51.87
CHA.7.543	Без ИК ₅₀

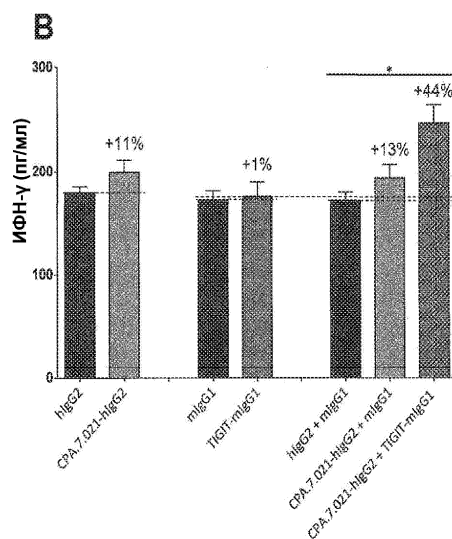
Фиг. 7А

CHA.7.544	Без ИК ₅₀
CHA.7.545	96.06
CHA.7.546	92.05
CHA.7.547	27.94
CHA.7.548	18.98
CHA.7.549	36.12
CHA.7.550	58.34

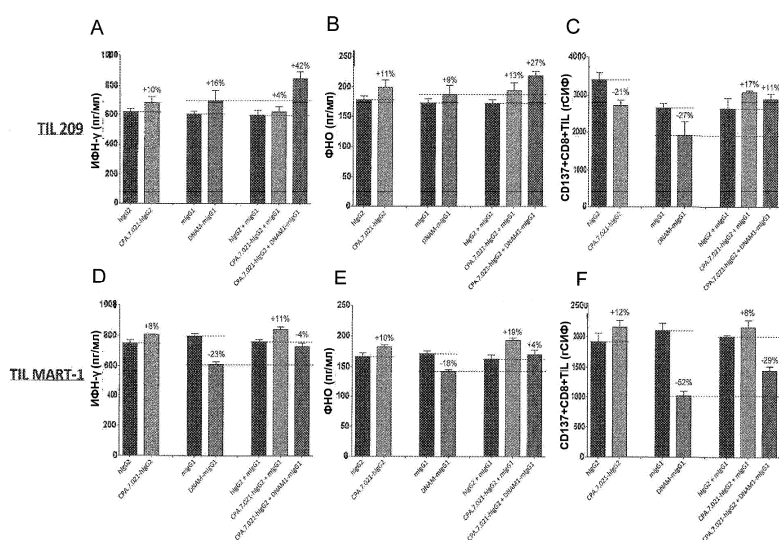
Фиг. 7В



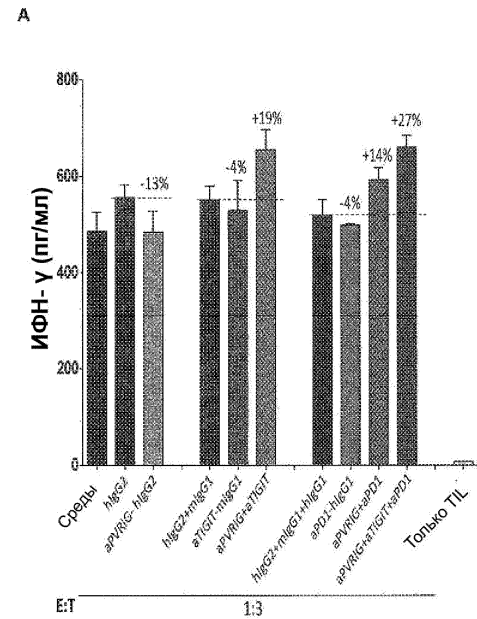
Фиг. 8А



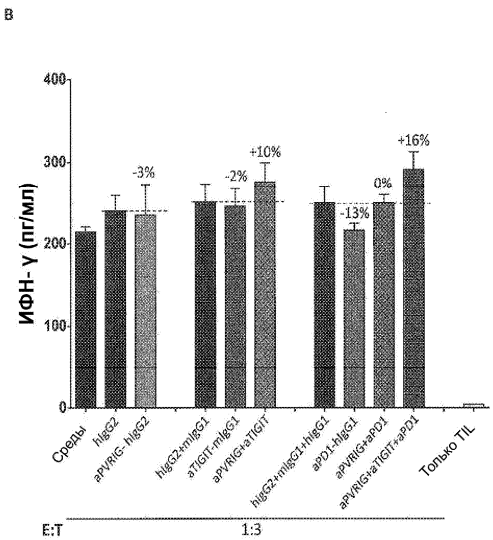
Фиг. 8В



Фиг. 9А-С



Фиг. 10А



Фиг. 10В

Гуманизированные последовательности VH антитела CH.7.518

Потенциальная гуманизированная последовательность, основанная на акцепторном каркасе IMGT IGHV1-46*01 (AbM CDR определения)

IGHV1-46*01 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYMMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSCGSTSYAQKFGQGRVITMDTSTSTVYMESSLRSSEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 25)

Связывающая область IMGT J00256|IGHJ4*01|YFDYWGQGITLVSS (SEQ ID NO: 26)

seq	10	20	30	40	50	60	70	80	90
AbM	b b b	p	p b b b	b b	b b i	i b b	b	i b	b b b x
518	EVQLQSSGP	ELVKPGASVKISCKAS	GYTFTDYNIN	WVKQSHGKSLEWIG	YIYPYIGGSG	YNQKFYSKATLSADNPSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAR			
1-46*01	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKAS	GYTFTSYMMH	WVRQAPGQGLEWMG	IINPSCGSTS	YAKQFGGRVITMDTSTSTVYMESSLRSSEDTAVYYCAR				
h518H1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKAS	GYTFTDYNIN	WVRQAPGQGLEWMG	YIYPYIGGSG	YAKQFGGRVITMDTSTSTVYMESSLRSSEDTAVYYCAR				
h518H2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKAS	GYTFTDYNIN	WVRQAPGQGLEWIG	YIYPYIGGSG	YAKQFGGRVITMDTSTSTVYMESSLRSSEDTAVYYCAR				
h518H3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKAS	GYTFTDYNIN	WVRQAPGQGLEWIG	YIYPYIGGSG	YAKQFGGRATDTATSTSTAYMESSLRSSEDTAVYYCAR				
h518H4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKAS	GYTFTDYNIN	WVRQAPGQGLEWIG	YIYPYIGGSG	YAKQFGGRATLTADNSTSTAYMESSLRSSEDTAVYYCAR				
	V		#		M				

seq	100	110	120
AbM		i	b b b
518	EDKTARNAMDY	WGQGLTVTVSS	
h518H1	EDKTARNAMDY	WGQGLTVTVSS	
h518H2	EDKTARNAMDY	WGQGLTVTVSS	
h518H3	EDKTARNAMDY	WGQGLTVTVSS	
h518H4	EDKTARNAMDY	WGQGLTVTVSS	
	#		

№ замены дезамидирования: Q/S/A A

Фиг. 11А

Гуманизированные последовательности VL антитела CHA.7.518

Потенциальная гуманизованная последовательность, основанная на акцепторном каркасе IMGT IGKV1-39*01

IGKV1-39*01
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQSYSTPP (SEQ ID NO: 33)

[illegible]

```

seq      90      100
AbM      90      100
        ibi iib i  b b b
518      QHFWGTPYT FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 35 )

```

```

IGKV1-29  QQSYSTPP (SEQ ID NO: 36 )
h518L1    QHFWGTFYT FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 37 )
h518L2    QHFWGTFYT FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 38 )
h518L3    QHFWGTFYT FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 39 )

```

Ⓜ Замены дезамидирования: Q/S/A/D
Ⓢ Замены окисления триптофана: Y/F/H

Фиг. 11В

Гуманизированные последовательности VH антитела CHA.7.538_1

Потенциальная гуманизованная последовательность, основанная на акцепторном каркасе IMGT IGHV1-39*01

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHVWRQAPGGGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFGQGRVTMTTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 40)

Заголовок области: INGT J00356 [IGHJ4+01]YFYVQGGTFTVYSS (SEQ ID NO: 41)

seq	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
538.1	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
538.1	QVQTQGSAGAVPPGASGVKSKTS	GTATFTNLY	HWKAPGGGLRWG	VINPQSGGITY	YNDKFKVTKT	TADKSSAVTYS	LSL	YDSDAVFYCAR		
1-4601	QVQLVDSGAEVKVKGASVKVKCKAS	GYTFTSYVNH	HWKRAQGGGLRWG	INFPSSGSTS	YAKQKGVIT	TDITSTST	YVNL	LSLSLSEDTAVYICAR		
1-5381H	QVQLVDSGAEVKVKGASVKVKCKAS	GYTFTSYVNH	HWKRAQGGGLRWG	VINPQSGGITY	YAKQKGVIT	TDITSTST	YVNL	LSLSLSEDTAVYICAR		
1-5381H	QVQLVDSGAEVKVKGASVKVKCKAS	GYTFTSYVNH	HWKRAQGGGLRWG	VINPQSGGITY	YAKQKGVIT	TDITSTST	YVNL	LSLSLSEDTAVYICAR		
1-5381H	QVQLVDSGAEVKVKGASVKVKCKTS	GTATFTNLY	HWKAPGGGLRWG	VINPQSGGITY	YAKQKGVIT	TADTSTST	YVNL	LSLSLSEDTAVYICAR		

```

seq      100      110
AbM      i      b b b
538_1    SETHDTWFPAY WGGQTLTVTSSA (SEQ ID NO: 42 )
          i      b b b      1-464; disclosed as SEQ ID NO: 43
h5381H1  SETHDTWFPAY WGGQTLTVTSS (SEQ ID NO: 44 )
h5381H2  SETHDTWFPAY WGGQTLTVTSS (SEQ ID NO: 45 )
h5381H3  SETHDTWFPAY WGGQTLTVTSS (SEQ ID NO: 46 )
h5381H4  SETHDTWFPAY WGGQTLTVTSS (SEQ ID NO: 47 )
          e

```

Замены дезамидирования: Q/S/A
@ Замены окисления триптофана: Y/F/H

Фиг. 11С

Гуманизированные последовательности VL антитела CHA.7.538_1

Потенциальная гуманизованная последовательность, основанная на акцепторном каркасе IMGT IGHV1-39*01

IGKV1-39*01
DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKGAPKLLIYAASSLSQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPP (SEQ ID NO: 48)

Связывающая область IMG1 J00242|IGKJ2*01|YTFGGQTKLEIK (SEQ ID NO:49)

IGKV1-17*02

DIQTQSPSSLSASVGGDRVITTCRASCGIRNDLGWYQKPKGAPKRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISNLQPEDFATYYCLOHNSYPP (SEQ ID NO: 50)

seq	10	20	30	40	50	60	70	80
AbM	b b b	p p	b b b	b b b	i i i	i i i	b b b	b b b
538	DIVMTQSGQFSTISVGDVRVITC	KASQGVRIAVA	NFQKPGQKAPKALY	LASTHT	GVPSRFGSGSGDTDFLTLS	ISVQGVNDLADYFC		

IGKVI-39	DIQMTQSGSISVSGVDRTVTC	PAQSQISGSLN	HYQKPGKAPKALY	AASLSG	GVPSRFGSGSGDTDFLTLS	ISLQGPEDFATYTC		
h33-31	DIQMTQSGSISVSGVDRTVTC	KASQGVRIAVA	HYQKPGKAPKALY	LASTHT	GVPSRFGSGSGDTDFLTLS	ISLQGPEDFATYTC		
h33BL2	DIQMTQSGSISVSGVDRTVTC	KASQGVRIAVA	NFQKPGKAPKALY	LASTHT	GVPSRFGSGSGDTDFLTLS	ISVQGPEDFATYTC		
	I T		S				L F	

```

seq      90      100
AbM      90      100
          ibi  iib  i   b b b
538      LQHWNYPYT FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 51 )
          *
```

```
IGKV1-39  QQSYSTPP (SEQ ID NO: 52 )
h538L1    LQHWNPYT FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 53 )
h538L2    LQHWNPYT FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 54 )
@#
```

Замены дезамидирования: Q/S/A/D
Замены окисления триптофана: Y/F/H

Фиг. 11D

Гуманизированные последовательности VH антитела CHA.7.538_2

Потенциальная гуманизированная последовательность, основанная на акцепторном каркасе IMGT IGHV1-46*01

IGHV1-46*01
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYMHVWRQAPGGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMEISSLRSEDVAVYYCAR (SEQ ID NO:55)

[illegible]

```
seq      100      110
AbM      i b b b
538_2    PYYGSSYGFAP WGQGTlVTVSA (SEQ ID NO:57 )
h5382H1  PYYGSSYGFAP WGQGTlVTVS * (1-46*U1 disclosed as SEQ ID NO:58 )
h5382H2  PYYGSSYGFAP WGQGTlVTVS (SEQ ID NO:59 )
h5382H3  PYYGSSYGFAP WGQGTlVTVS (SEQ ID NO:60 )
h5382H3  PYYGSSYGFAP WGQGTlVTVS (SEQ ID NO:61 )
```

Замены дезамидирования: Q/S/A
@ Замены окисления триптофана: Y/F/H

Фиг. 11Е

040773

Что именно	Последовательности
VH гуманизированного CHA.7.518 h518HH1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFDYNINWVRQAPGQGLEWMGYIYPYIGGS GYA QKFQ GRVTMTTRDTSTSTVYME LS SRSEDTAVYYCARE DKTARN AMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:62)
VH гуманизированного CHA.7.518 h518HH2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFDYNINWVRQAPGQGLEWIGYIYPYIGGS GYA QKFQ RVMTADTSTSTVYME LS SRSEDTAVYYCARE DKTARN AMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:63)
VH гуманизированного CHA.7.518 h518HH3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFDYNINWVRQAPGQGLEWIGYIYPYIGGS GYA QKFQ RATLTADTSTSTAYME LS SRSEDTAVYYCARE DKTARN AMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:64)
VH гуманизированного CHA.7.518 h518HH4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFDYNINWVRQAPGQGLEWIGYIYPYIGGS GYA QKFQGR ATLTADNSTSTAYME LS SRSEDTAVYYCARE DKTARN AMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:65)
VH гуманизированного CHA.7.518 h518HL1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIY SN LAWYQOKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGT DFTLTISLQPEDFATYYCQHFWGTPYTFGGGKLEIK (SEQ ID NO:66)
VH гуманизированного CHA.7.518 h518HL2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIY SN LAWYQOKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGT DYTLTISLQPEDFATYYCQHFWGTPYTFGGGKLEIK (SEQ ID NO:67)
VH гуманизированного CHA.7.518 h518HL3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRVSENIY SN LAWYQOKPGKAPKLLIYEATNLAEGVPSRFSGSGSGT DYTLTISLQPEDFATYYCQHFWGTPYTFGGGKLEIK (SEQ ID NO:68)

Фиг. 12А

Что именно	Последовательности
VH гуманизированного CHA.7.538_1 h5381HH1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTNYLIEWVRQAPGQGLEWMGVINPGSGGIY YA QKFQ GRVTMTTRDTSTSTVYME LS SRSEDTAVYYCARSETHDTWFA Y WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:69)
VH гуманизированного CHA.7.538_1 h5381HH2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTNYLIEWVRQAPGQGLEWIGVINPGSGGIY YA QKFQ RVMTADTSTSTVYME LS SRSEDTAVYYCARSETHDTWFA Y WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:70)
VH гуманизированного CHA.7.538_1 h5381HH3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYAFTNYLIEWVRQAPGQGLEWIGVINPGSGGIY YA QKFQ RVTLTADTSTSTAYME LS SRSEDTAVYYCARSETHDTWFA Y WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:71)
VH гуманизированного CHA.7.538_1 h5381HH4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYAFTNYLIEWVRQAPGQGLEWIGVINPGSGGIY YA QKFQ RVTLTADKSTSTAYME LS SRSEDTAVYYCARSETHDTWFA Y WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:72)
VH гуманизированного CHA.7.538_1 2 VL h538HL1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVRI AV AWYQOKPGKAPKLLIYL AST RHTGVPSRFSGSGSGT DFTLTISLQPEDFATYYCLOHWNPYPYTFGGGKLEIK (SEQ ID NO:73)
VH гуманизированного CHA.7.538_1 2 VL h538HL2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVRI AV AWFQOKPGKAPKALIVL AST RHTGVPSRFSGSGSGT DFTLTISVQPEDFATYYCLOHWNPYPYTFGGGKLEIK (SEQ ID NO:74)

Фиг. 12В

Что именно	Последовательности
VH гуманизированного CHA.7.538_2 VH h5382HH1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFETNYWIGWVRQAPGQGLEWMGDIYPGGGYTNYA Q KF QGRVTMTTRDTSTSTVYME LS SRSEDTAVYYCARPYYGSSYGFAFWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:75)
VH гуманизированного CHA.7.538_2 VH h5382HH2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFETNYWIGWVRQAPGQGLEWIGDIYPGGGYTNYA Q KFQ GRVTMTADTSTSTVYME LS SRSEDTAVYYCASPYYGSSYGFAFWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:76)
VH гуманизированного CHA.7.538_2 VH h5382HH3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFETNYWIGWVRQAPGQGLEWIGDIYPGGGYTNYA Q KFQ GRATLTADTSTSTAYME LS SRSEDTAVYYCASPYYGSSYGFAFWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:77)
VH гуманизированного CHA.7.538_1/538_2 VL h538HL1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVRI AV AWYQOKPGKAPKLLIYL AST RHTGVPSRFSGSGSGT DFTLTISLQPEDFATYYCLOHWNPYPYTFGGGKLEIK (SEQ ID NO:78)
VH гуманизированного CHA.7.538_1/538_2 VL h538HL2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVRI AV AWFQOKPGKAPKALIVL AST RHTGVPSRFSGSGSGT DFTLTISVQPEDFATYYCLOHWNPYPYTFGGGKLEIK (SEQ ID NO:79)

Фиг. 12С

Пары VH-VL гуманизированного CHA.7

Антитело CHA.7.518

	VH	VL
ch518	Химерный VH	Химерный VL
h518-1	h518HH1	h518HL1 (необязательный)
h518-2	h518HH2	h518HL2
h518-3	h518HH3	h518HL3
h518-4	h518HH3	h518HL3
h518-5	h518HH4	h518HL3

Антитело CHA.7.518_1

	VH	VL
ch538.1	Химерный VH	Химерный VL
h538.1-1	h538.1HH1	h538.1HL1 (необязательный)
h538.1-2	h538.1HH2	h538.1HL2
h538.1-3	h538.1HH3	h538.1HL2
h538.1-4	h538.1HH4	h538.1HL2

Антитело CHA.7.518_2

	VH	VL
ch538.2	Химерный VH	Химерный VL
h538.2-1	h538.2HH1	h538.1HL1 (необязательный)
h538.2-2	h538.2HH2	h538.1HL2
h538.2-3	h538.2HH3	h538.1HL2

Фиг. 13

Антитело (mgG)	CD56 int NK человека (gMFI, 10 мкг/мл)	CD8+ Т-клетки человека (gMFI, 10 мкг/мл)	Exp1 OE/par яванского макака (gMFI, 3,3 мкг/мл)	NK-клетки яванского макака (gMFI, 10 мкг/мл)	CD8+ Т-клетки яванского макака (gMFI, 10 мкг/мл)
CHA.7.502	1.97	1.41	60.49	Не тестировали	Не тестировали
CHA.7.503	3.15	1.96	106.3	Не тестировали	Не тестировали
CHA.7.506	Не тестировали	Не тестировали	0.77	Не тестировали	Не тестировали
CHA.7.508	3.6	4.09	41.49	Не тестировали	Не тестировали
CHA.7.510	3.13	2.73	38.21	Не тестировали	Не тестировали
CHA.7.512	1.30	1.15	8.96	Не тестировали	Не тестировали
CHA.7.514	4.16	5.15	65.20	Не тестировали	Не тестировали
CHA.7.516	4.22	4.09	60.05	1.76	2.09
CHA.7.518	5.08	6.69	83.51	1.92	2.09
CHA.7.520	1.13	1.04	Не тестировали	Не тестировали	Не тестировали
CHA.7.522	2.06	1.90	27.24	Не тестировали	Не тестировали
CHA.7.524	5.50	6.12	66.32	1.78	2.02
CHA.7.525	1.98	1.76	0.85	Не тестировали	Не тестировали
CHA.7.526	2.08	1.71	0.79	Не тестировали	Не тестировали
CHA.7.527	1.16	0.99	Не тестировали	Не тестировали	Не тестировали
CHA.7.528	3.08	3.63	12.2	1.21	1.18
CHA.7.530	6.04	6.47	60.80	1.73	1.89
CHA.7.534	2.60	1.96	46.27	Не тестировали	Не тестировали
CHA.7.535	2.24	1.28	0.82	Не тестировали	Не тестировали
CHA.7.537	3.90	3.41	1.55	1.18	1.19
CHA.7.538	6.49	6.17	15.16	1.36	1.45
CHA.7.543	4.48	4.33	0.83	1.35	1.39
CHA.7.544	2.36	2.54	61.09	Не тестировали	Не тестировали
CHA.7.545	2.54	2.82	0.91	Не тестировали	Не тестировали
CHA.7.546	2.75	2.95	0.85	Не тестировали	Не тестировали
CHA.7.547	2.21	1.13	26.65	Не тестировали	Не тестировали
CHA.7.548	3.15	3.35	4.25	1.18	1.09
CHA.7.549	3.05	1.42	1.00	Не тестировали	Не тестировали
CHA.7.550	1.60	1.29	0.90	Не тестировали	Не тестировали

Фиг. 14

Антитело (mIgG)	ИК ₅₀ (нМ)
CHA.7.502	39.90
CHA.7.503	Без ИК ₅₀
CHA.7.506	31.65
CHA.7.508	37.88
CHA.7.510	55.00
CHA.7.512	839.6
CHA.7.514	38.88
CHA.7.516	33.11
CHA.7.518	23.15
CHA.7.520	619.3
CHA.7.522	50.48
CHA.7.524	30.20
CHA.7.525	85.52
CHA.7.526	58.88
CHA.7.527	Без ИК ₅₀
CHA.7.528	28.88
CHA.7.530	34.56
CHA.7.534	181.4
CHA.7.535	821.1
CHA.7.537	38.95
CHA.7.538	51.87
CHA.7.543	Без ИК ₅₀
CHA.7.544	Без ИК ₅₀
CHA.7.545	96.06
CHA.7.546	92.05
CHA.7.547	27.94
CHA.7.548	18.98
CHA.7.549	36.12
CHA.7.550	58.34

Фиг. 15

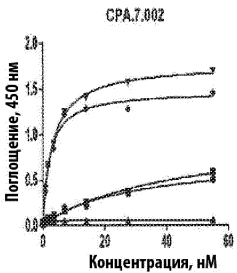
Антитело (hIgG)	Целевая клеточная линия	Кратность изменения в цитотоксичности по сравнению с контролем
CPA.7.002	Reh	2.9
	MOLM-13	1.9
CPA.7.005	Reh	1.6
	MOLM-13	1.6
CPA.7.021	Reh	1.9
	MOLM-13	0.7
CPA.7.036	Reh	0.9
CPA.7.037	Reh	1.1
CPA.7.038	Reh	0.8
CPA.7.041	Reh	0.7
CPA.7.042	Reh	0.7
CPA.7.050	Reh	1.6
TIGIT	Reh	1.1
	MOLM-13	1.1
DNAM-1	Reh	1.2

Фиг. 16

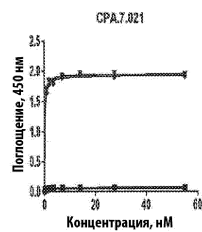
NP_076975.2-Homo sapiens XP_005549281.1-Macaca fascicularis XP_003732227.1-Callithrix jacchus XP_001103603.1-Macaca mulatta	TPREVWVQVRMEATELSSTFTRGCGFLGSGSISLVTVSWGGPBGAGGTTLAVLHPERGIQW TPREVWVQVRMEATELSSTFTRGCGFLGSGSISLVTVSWGGPBGAGGTTLAVLHPERGIQW TPREVWVQVRMEATELSSTFTRGCGFLGSGSISLVTVSWGGPBGAGGTTLAVLHPERGIQW TPREVWVQVRMEATELSSTFTRGCGFLGSGSISLVTVSWGGPBGAGGTTLAVLHPERGIQW *****:***** :***** *****:***** *****:*****
NP_076975.2-Homo sapiens XP_005549281.1-Macaca fascicularis XP_003732227.1-Callithrix jacchus XP_001103603.1-Macaca mulatta	APARQARWETQSSISLILEGSRASSPCANTTFCKTFASFPEGSWEACGSLPPSSDPGLSA APARQARWETQSSISLILEGSRASSPCANTTFCKTFASFPEGSWEACGSLPPSSDPGLSA APARQARWETQSSISLILEGSRASSPCANTTFCKTFASFPEGSWEACGSLPPSSDPGLSA APARQARWETQSSISLILEGSRASSPCANTTFCKTFASFPEGSWEACGSLPPSSDPGLSA APARQARWETQSSISLILEGSRASSPCANTTFCKTFASFPEGSWEACGSLPPSSDPGLSA *****:*****:***** *****:*****:***** *****:*****
NP_076975.2-Homo sapiens XP_005549281.1-Macaca fascicularis XP_003732227.1-Callithrix jacchus XP_001103603.1-Macaca mulatta	PPTTPATILRAD PPTTPATILRAD PPTTPATILRAD PPTTPATILRAD * : ***

SEQ ID NO: 80-83, соответственно в порядке появления

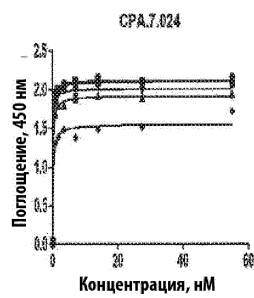
Фиг. 17



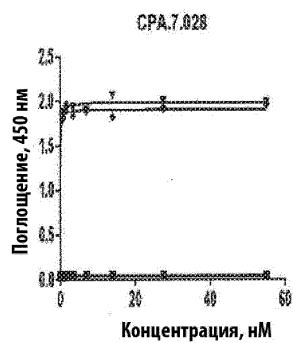
Фиг. 18А



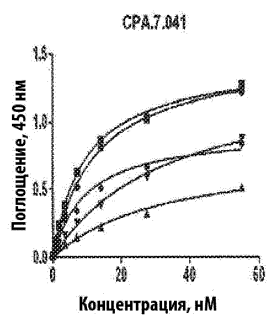
Фиг. 18В



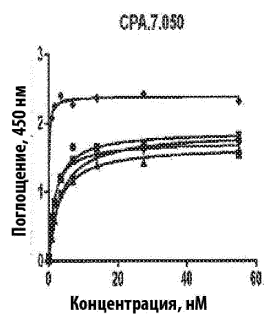
Фиг. 18С



Фиг. 18D



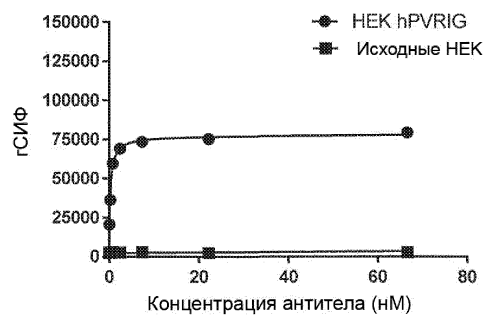
Фиг. 18Е



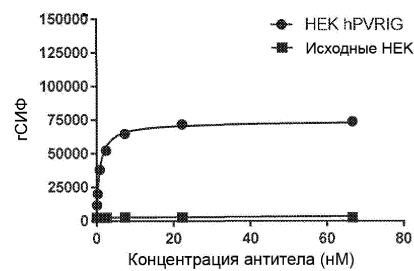
Фиг. 18F

мкАт	Кросс-реактивность с яванским макаком	Эпитопный бин	Эпитопная группа
CPA.7.002	+	1	2
CPA.7.021	-	1	1
CPA.7.024	+++	1	3
CPA.7.028	-	1	1
CPA.7.041	++	1	2
CPA.7.050	+++	4	3

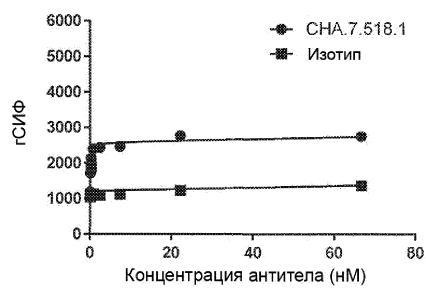
Фиг. 19



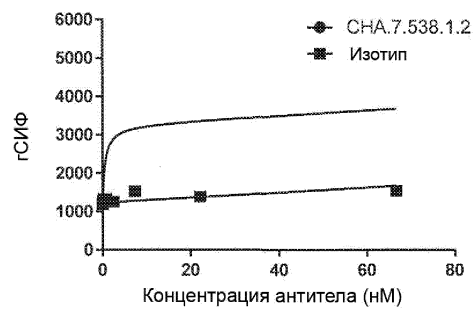
Фиг. 20А



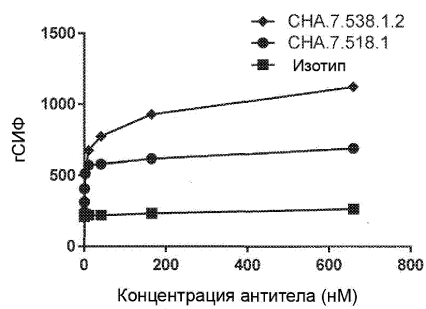
Фиг. 20В



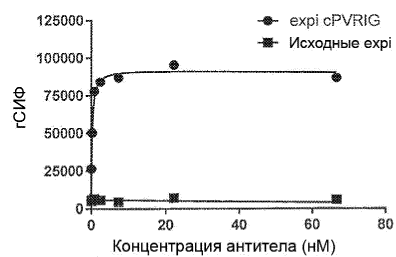
Фиг. 21А



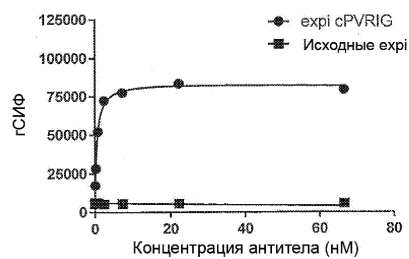
Фиг. 21В



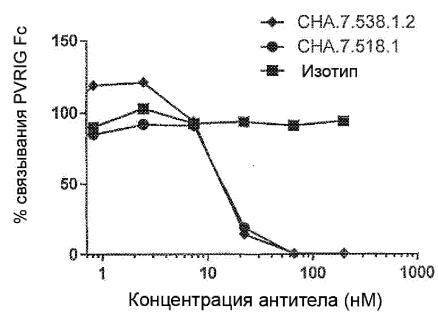
Фиг. 22



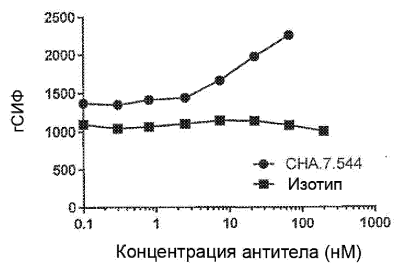
Фиг. 23А



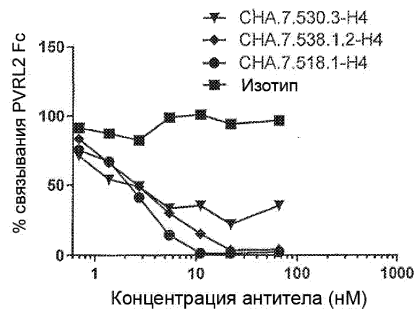
Фиг. 23В



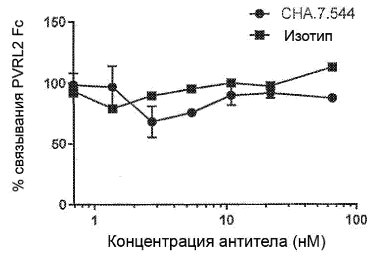
Фиг. 24А



Фиг. 24В



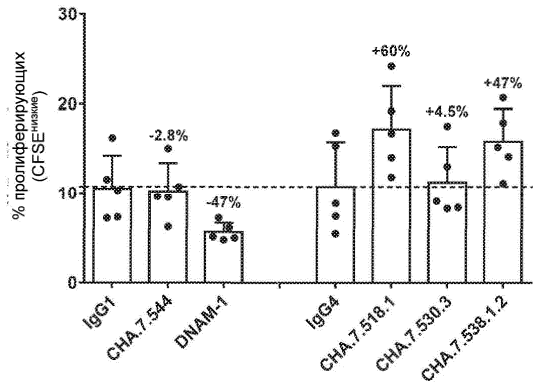
Фиг. 25А



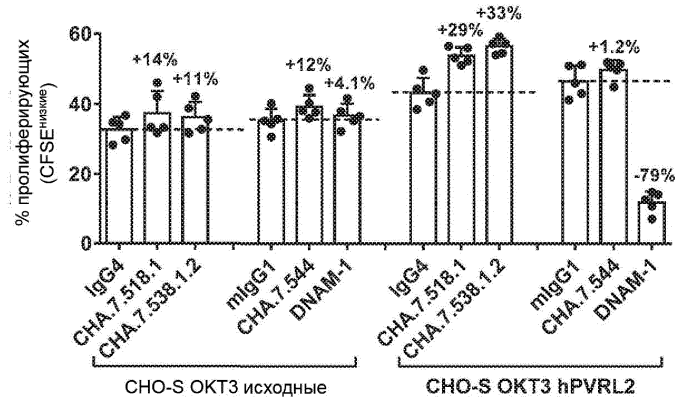
Фиг. 25В

	CHA.7.518.1 (Alexa 647)	CHA.7.538.1.2 (Alexa 647)
Изотип (неконъюгированное)	100	100
CHA.7.518.1 (неконъюгированное)	14	32
CHA.7.518.1.2 (неконъюгированное)	7	7

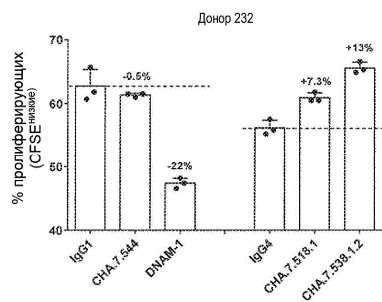
Фиг. 26



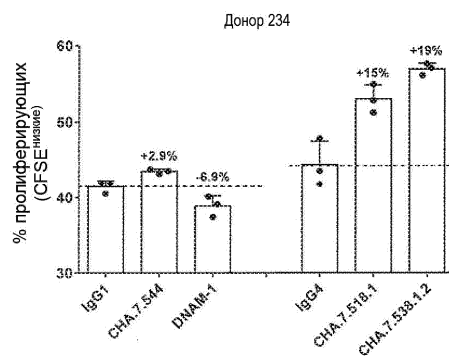
Фиг. 27А



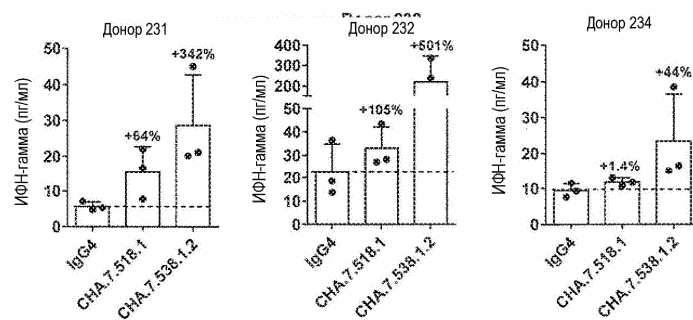
Фиг. 27В



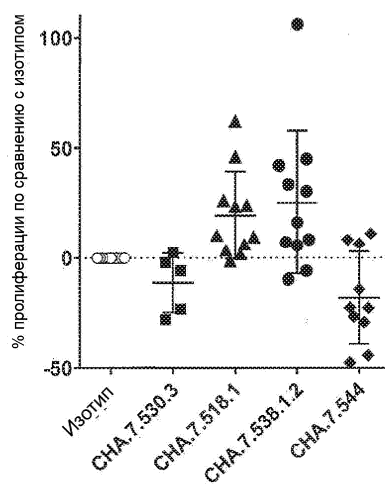
Фиг. 28А



Фиг. 28В

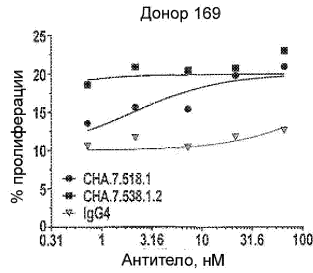


Фиг. 28С

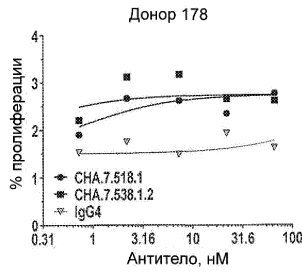


Фиг. 29

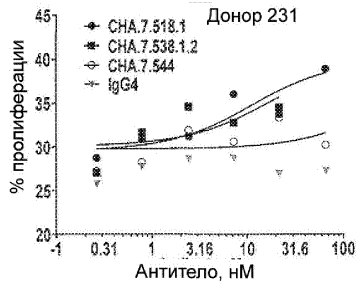
040773



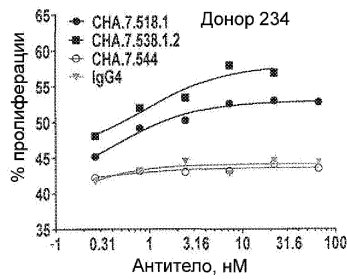
Фиг. 30А



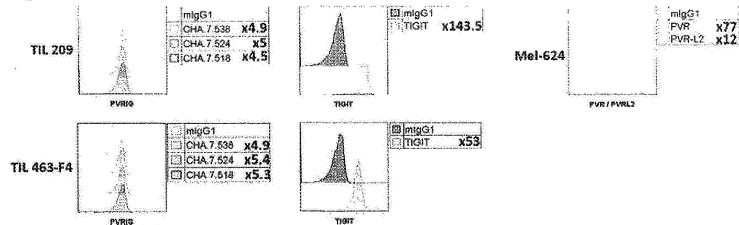
Фиг. 30В



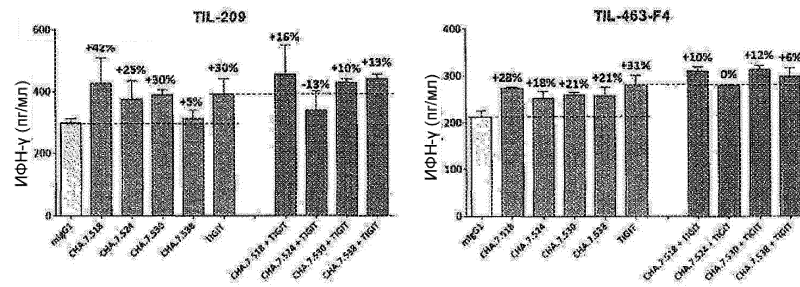
Фиг. 30С



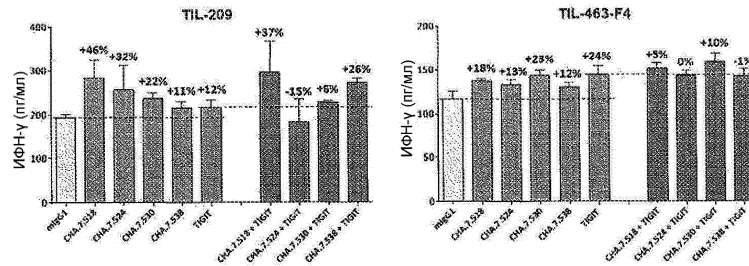
Фиг. 30D



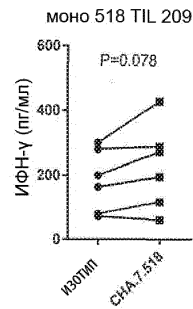
Фиг. 31А



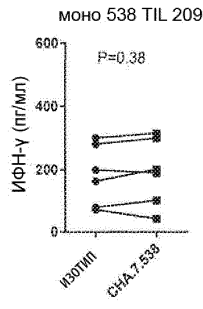
Фиг. 31В



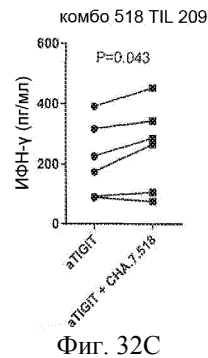
Фиг. 31С



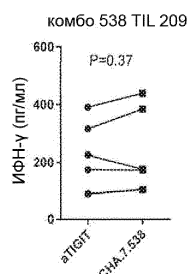
Фиг. 32А



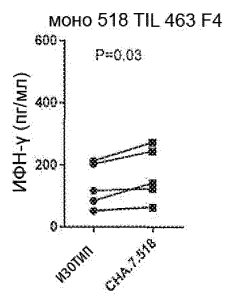
Фиг. 32В



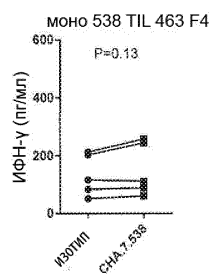
Фиг. 32С



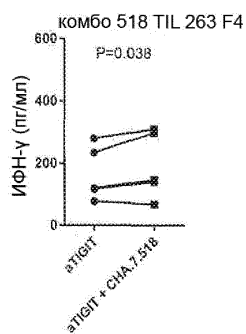
Фиг. 32D



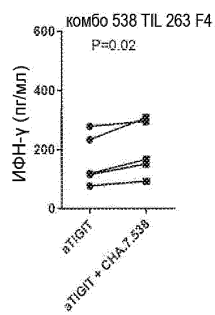
Фиг. 32E



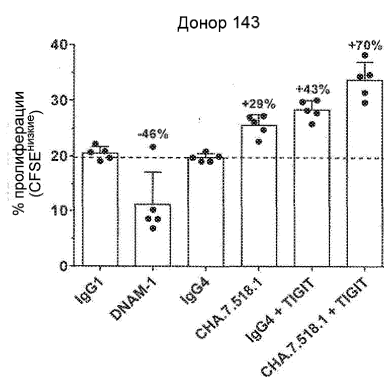
Фиг. 32F



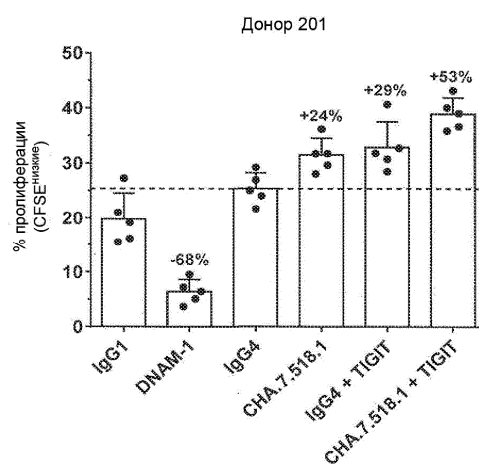
Фиг. 32G



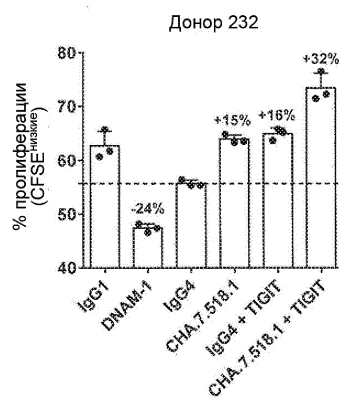
Фиг. 32H



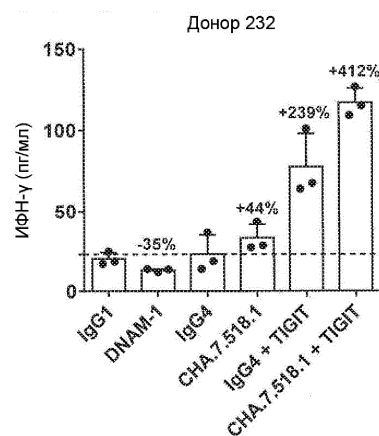
Фиг. 33А



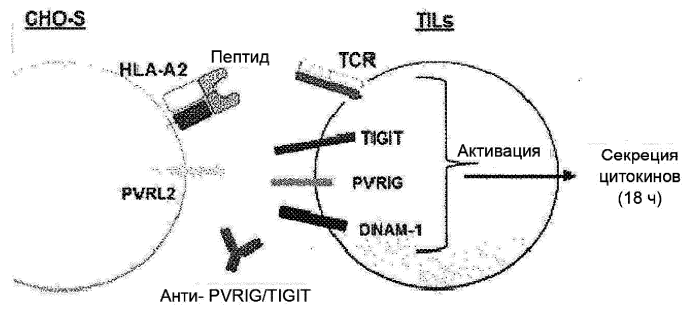
Фиг. 33В



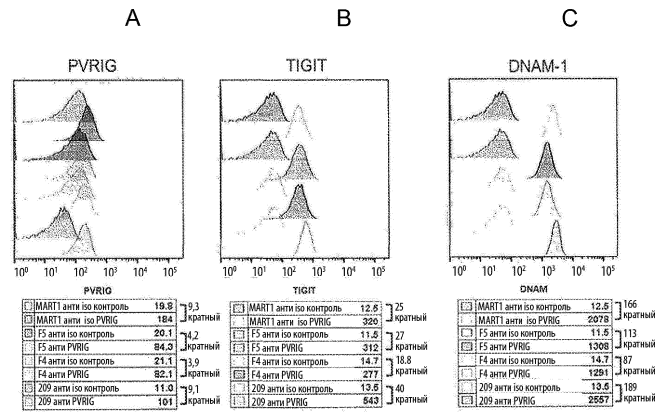
Фиг. 34А



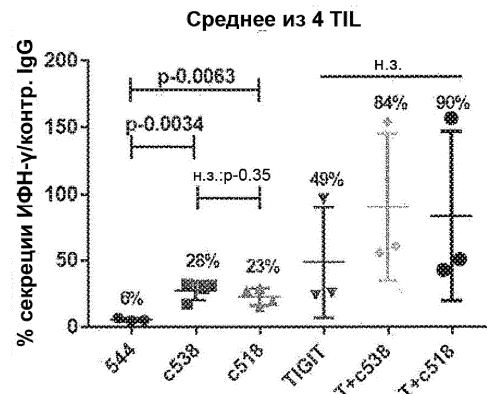
Фиг. 34В



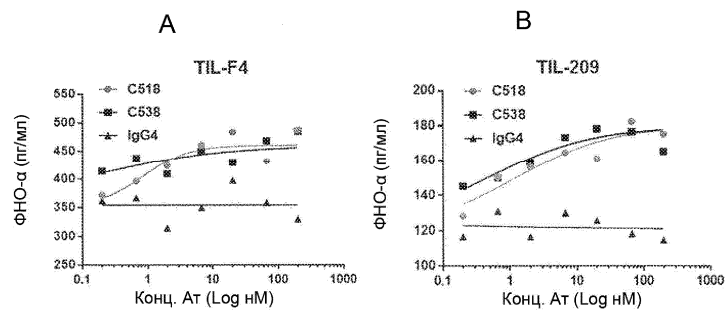
Фиг. 35



Фиг. 36А-С



Фиг. 37



Фиг. 38А-В

Пептид 0.5 пг/мл		TIGIT	544	c538	c518	TIGIT+c518
TIL-209	ИФН-γ	111%	11%	29%	29%	171%
	ФНО-α	181%	17%	20%	23%	216%
TIL-F4	ИФН-γ	32%	<5%	<5%	11%	47%
	ФНО-α	63%	<5%	<5%	21%	83%
TIL-F5	ИФН-γ	37%	15%	39%	56%	86%
	ФНО-α	44%	5%	<5%	9%	54%

Фиг. 39А

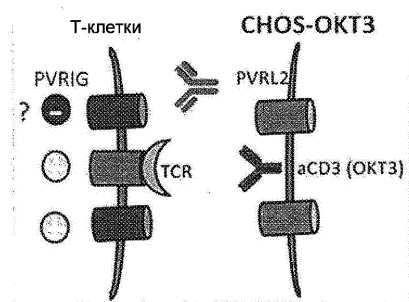
Пептид 0.1 пг/мл		544	c538	c518
TIL-209	ИФН-γ	12%	48%	39%
	ФНО-α	20%	47%	38%
TIL-F4	ИФН-γ	8%	13%	9%
	ФНО-α	7%	31%	15%
TIL-F5	ИФН-γ	3%	31%	21%
	ФНО-α	0%	10%	14%

Фиг. 39В

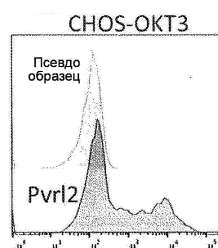
ИФН-γ

Пептид 0.1 пг/мл		544	c538	c518	TIGIT	c538+ TIGIT	c518+ TIGIT
TIL-209	ИФН-γ	2%	16%	19%	97%	154%	157%
	ФНО-α	7%	28%	27%	150%	190%	180%
TIL-F4	ИФН-γ	2%	12%	7%	26%	56%	51%
	ФНО-α	15%	31%	18%	39%	55%	60%
TIL-F5	ИФН-γ	8%	4%	10%	24%	61%	43%
	ФНО-α	11%	16%	20%	35%	56%	59%
MART-1	ИФН-γ	50%	53%	81%	39%	87%	81%

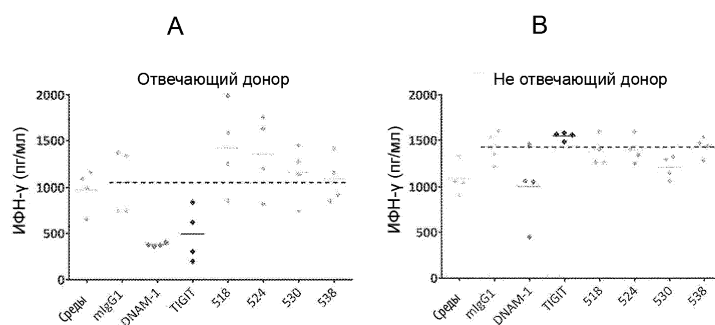
Фиг. 39С



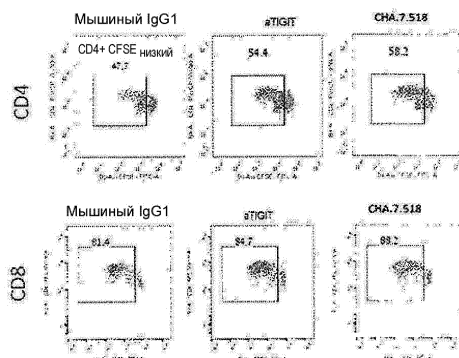
Фиг. 40А



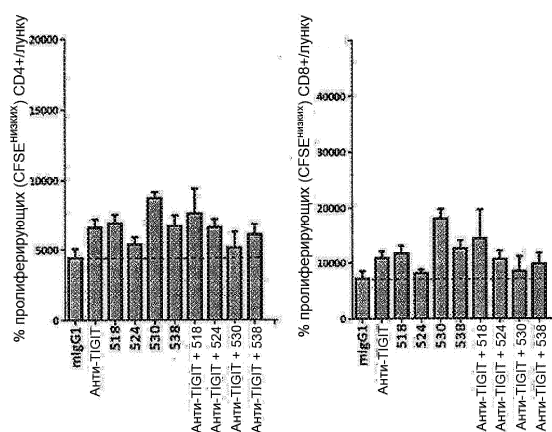
Фиг. 40В



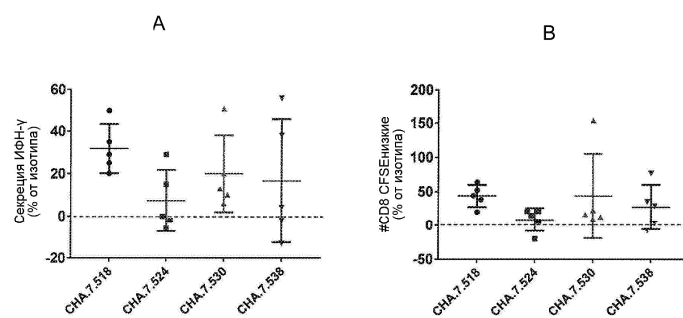
Фиг. 41А-В



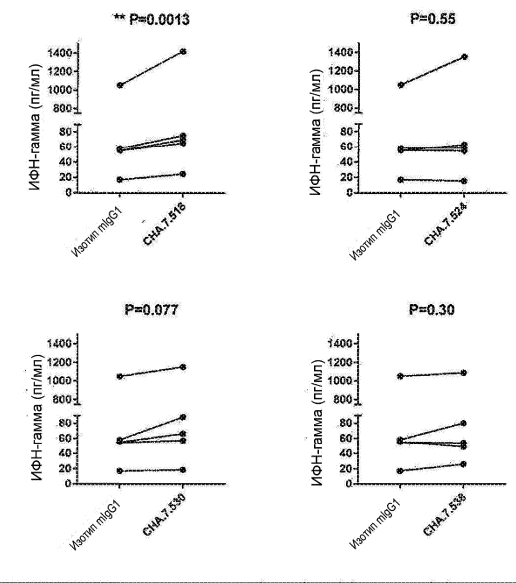
Фиг. 42А



Фиг. 42В



Фиг. 43А-В



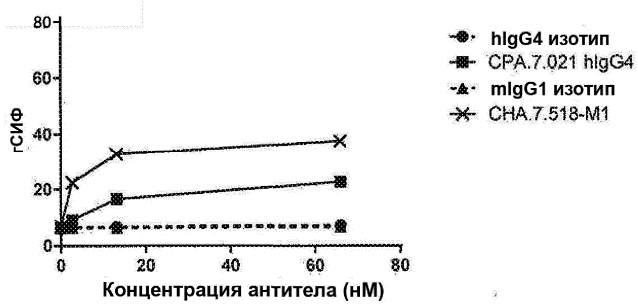
Фиг. 43С

% влияния (против изотипа)	Эксп. №	Донор	ИФН-гамма	Общее количество CD4+ CFSE	Общее количество CD8+ CFSE
CHA.7.518	410-IB-003 3		25%	24%	52%
	410-IB-003 72		29%	58%	64%
	400-ES-002 226		50%	16%	38%
	400-ES-002 345		20%	-26%	20%
	400-ES-002 ES_001		35%	39%	44%
	400-ES-003 ES_002		-3%	-22%	-17%
	400-ES-003 ES_004		-20%	-14%	-15%
	400-ES-003 ES_005		1%	5%	1%
	400-ES-003 ES_006		-11%	4%	12%
	400-ES-003 ES_007		4%	6%	15%
CHA.7.524	410-IB-003 3		-2%	-9%	-20%
	410-IB-003 72		0%	23%	15%
	400-ES-002 226		-6%	0%	6%
	400-ES-002 345		15%	-21%	21%
	400-ES-002 ES_001		29%	25%	21%
	400-ES-003 ES_002		-2%	-10%	-14%
	400-ES-003 ES_004		-18%	-8%	-7%
	400-ES-003 ES_005		12%	10%	12%
	400-ES-003 ES_006		2%	8%	-10%
	400-ES-003 ES_007		4%	-4%	2%
CHA.7.530	410-IB-003 3		20%	16%	10%
	410-IB-003 72		51%	98%	154%
	400-ES-002 226		13%	3%	13%
	400-ES-002 345		6%	-25%	23%
	400-ES-002 ES_001		10%	20%	17%
	400-ES-003 ES_002		-15%	-23%	-29%
	400-ES-003 ES_004		-20%	-7%	-10%
	400-ES-003 ES_005		11%	5%	13%
	400-ES-003 ES_006		-20%	5%	17%
	400-ES-003 ES_007		0%	0%	11%
CHA.7.538	410-IB-003 3		-13%	1%	8%
	410-IB-003 72		38%	53%	77%
	400-ES-002 226		56%	24%	29%
	400-ES-002 345		-2%	-22%	35%
	400-ES-002 ES_001		4%	0%	3%
	400-ES-003 ES_002		0%	1%	1%
	400-ES-003 ES_004		-21%	-9%	-5%
	400-ES-003 ES_005		18%	-1%	0%
	400-ES-003 ES_006		-21%	6%	13%
	400-ES-003 ES_007		-4%	11%	20%

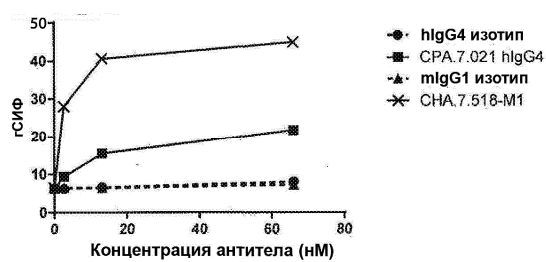
Фиг. 44

Клетки	Антитело	Kd	гСИФ
HEK hPVRIG	CRA.7.021 IgG4	2.939	18.17
HEK hPVRIG	CHA7.518 M1	0.36	42.24
Jurkat	CRA.7.021 IgG4	3.18	10.08
Jurkat	CHA7.518 M1	0.24	6.58

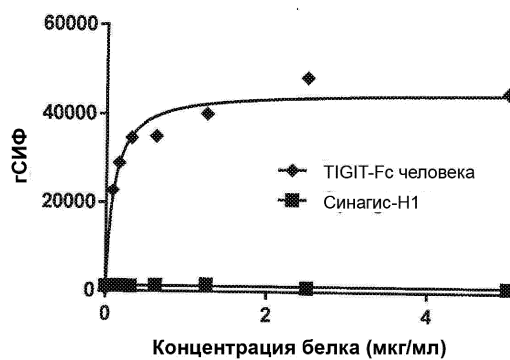
Фиг. 45А



Фиг. 45В

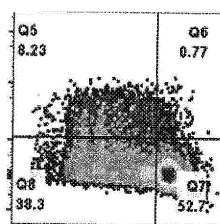


Фиг. 45С



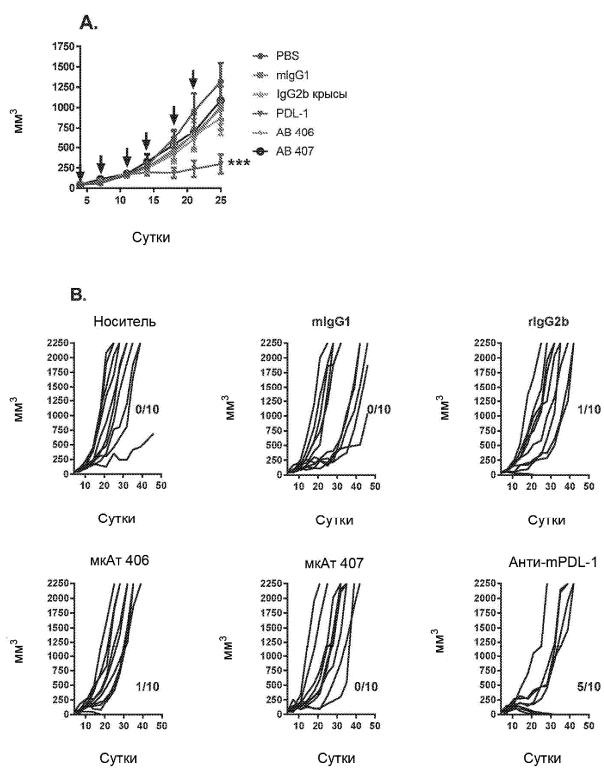
Фиг. 46А

PVR

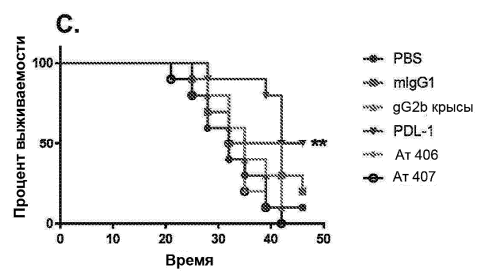


CFSE

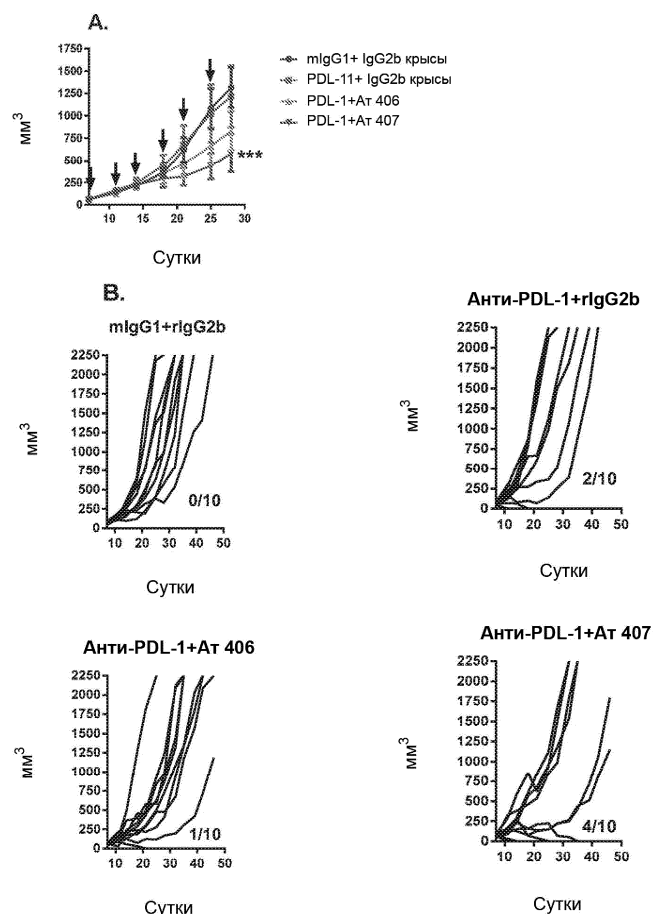
Фиг. 46В



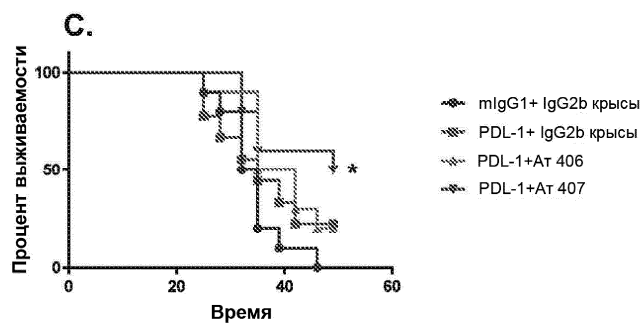
Фиг. 47А; В



Фиг. 47С



Фиг. 48А и В



Фиг. 48С

A)

AB-407 (BOJ-5G4-F4)

Тяжелая цепь: аминокислотная последовательность

MEWNNVVFLLSVTAGVHSQVQLQQSGAELAKPGSSVMISCKASGYFTFN
YAVHWIKQTGGQALEWGTGYIAPGSGVTKYNEFKGKATLTVDKSSTAYMQLSSLTPVDTAIVYCASGTTFRFAYWGQ
GTLVTVSSAQTTAPSVYPLAPGCGDTSSTVTLGCLVKG (SEQ ID NO:84)

B)

AB-407 (BOJ-5G4-F4)

Тяжелая цепь: последовательность ДНК

ATGGAATGGAACGGGTCTTTCTCTCTCTCTGTCACTAAGTGCAGGAGTCCACTCCCAGGTCACG
TGACGACGCTGGAGCTGAGCTGGCAAAGCCTGGCTCTTCAGTGATGATTCTCGCAAGGCTCTGG
TTACACCTTTACCAACTATGCTGTGCACTGGATAAAGCAGACGACTGGACAGGCCCTTGAGTGGA
GGATATATTGCTCTGGAAGTGGAGTTACTAAATACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGA
CTGTAGACAAATCCTCAACCACAGCTACATGCAACTCAGCAGCCTGACACCTGTGGACACTGCGGT
CTATTACTGTGCAAGCGGAACACGAGGTTTGCTTATTGGGGCCAAGGCACTCTGGTCACTGTCTCT
TCA GCCCAAAACAACAGCCCATCTGTCTATCCACTGGCTCCTGGATGTGGTGATACAACCAAGC
TCCACGGTGACTCTGGGATGCTGTGTCAGGGC (SEQ ID NO:85)

C)

AB-407 (BOJ-5G4-F4)

Легкая цепь: аминокислотная последовательность

METDTHLLWVLLWVPGSTGDIVLTQSPALAVSLGQRATISCRASQSVLSSTYNLMQWYQQKPGQEP
KILYDASNLPSGIPARFSGSGSDFTLIDPVQADDIATYYCQSKDDPLTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO:86)

D)

AB-407 (BOJ-5G4-F4)

Легкая цепь: последовательность ДНК

ATGGAGACAGACACACTCTGCTATGGGTGCTGCTGCTCTGGGTTCCAGGCTCCACTGGTGACATTG
TGCTGACCCAGTCTCTGCTTTGGCTGTGCTCTAGGGCAGAGGGCCACAATCTCTGTAGAGCCAG
CCAAAGTGTCAGTTTATCCAGCTATAATCTCATGCAGTGGTACCAACAGAAACAGGACAGGAACCC
AAATCTCATCTATGATGTCATCAACCTACCATCTGGGATCCCTGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGT
CTGGGACAGACTTCACCTCACCATTGATCCTGTGCAGGCTGATGATATTGCAACCTATTACTGTCA
GCAGAGTAGAAGGATGACCCGCTCAGTTCGGTTCTGGGACCAAGCTGGAGATCAAA (SEQ ID NO:87)

Фиг. 49A-D

Константная область IgG1 человека (SEQ ID NO:88)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VIVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSINKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTTPVLDSDGSEFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHREALHNNHYTQKSLSLSPGK

Константная область IgG1 D265A человека (SEQ ID NO:89)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VIVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSINKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTTPVLDSDGSEFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHREALHNNHYTQKSLSLSPGK

Константная область IgG1 N297A человека (SEQ ID NO:90)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VIVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSINKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTTPVLDSDGSEFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHREALHNNHYTQKSLSLSPGK

Константная область IgG2 человека (SEQ ID NO:91)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VIVPSSNFGTQYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPGPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSN
KGLPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPMLDSDGSEFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHREALHNNHYTQKSLSLSPGK

Константная область IgG3 человека (SEQ ID NO:92)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VIVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTHTCPRCPPEPKSCDTPPPCPRCPPEPKSCD
TPPPCPRCPPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQ
FKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYNTTPPMLDSDGSEFLYSLK
LTVDKSRWQQGNIFSCSVMHREALHNNHYTQKSLSLSPGK

Константная область IgG4 человека (дикий тип) (SEQ ID NO:93)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
 VTPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCSPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
 PEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
 NKGLEPSSIIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVPFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Константная область IgG4 человека (шарнирный мутант S241P) (SEQ ID NO:94)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
 VTPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCF[]CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
 PEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
 NKGLEPSSIIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
 TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVPFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Легкая цепь каппа человека (SEQ ID NO:95)

RTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYSL
 SSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Легкая цепь лямбда человека (SEQ ID NO:96)

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAA
 SSYLSLTPEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Фиг. 50**БКД TIGIT человека (SEQ ID NO:97)**

MMTGTIETTGNISAEKGGSIILQCHLSSTTAQVTQVNWEQQDQLLAICNADLGWHISPSFKDRVAPGP
 GLGLTLQSLTVNDTGEYFCIYHTYPDGTYTGRIFLEVLESSVAEHGARFQIP

БКД TIGIT яванского макака (SEQ ID NO:98)

MMTGTIETTGNISAKKGGSVILQCHLSSTMAQVTQVNWEQHDHSLLAIRNAELGWHIYPAFKDRVAPG
 PGLGLTLQSLTMNDTGEYFCTYHTYPDGTYRGRIFLEVLESSVAEHSARFQIP

БКД PVR человека (SEQ ID NO:99)

DVVVQAPTQVPGFLGDSVTLPCYLQVPMNEVTHVSQLTWARHGESGSMVAFHQTGQPSYSESKRLEFV
 AARLGAELRNASLRMFGLRVEDEGNVTCLEVTFPQGSRSVDIWLRLAKPQNTAEVQKVQLTGEPVPM
 ARCVSTGGRPQAQITWHSDLGGMFNTSQVPGFLSGTVTVTSLWILVPSSQVDGKNVTCVHEHESFEKP
 QLLTVNLTVYYPEVVISGYDNNWYLGQNEATLTCDARSNPEPTGYNWSTTMGPLPPFAVAQGAQLLI
 RPVDKPIINTLINCNTNALGARQAEALTQVQKEGPPSEHSGMSRN

Фиг. 51

Компания	ID антитела	MFIr (OE/Par) hTIGIT	MFIr (OE/Par) cTIGIT
1	CPA.9.002	98	H/O
1	CPA.9.009	8.7	H/O
1	CPA.9.011	12	H/O
1	CPA.9.012	12	H/O
1	CPA.9.013	25	H/O
1	CPA.9.014	110	H/O
1	CPA.9.015	10	H/O
1	CPA.9.018	16	H/O
1	CPA.9.053	4.4	H/O
2	CPA.9.057	30	H/O
2	CPA.9.059	11	H/O
2	CPA.9.064	5	H/O
2	CPA.9.069	5	H/O
2	CPA.9.071	5.7	H/O
2	CPA.9.077	19	H/O
2	CPA.9.081	7.6	H/O
3	CPA.9.027	110	H/O
3	CPA.9.049	94	H/O
4	CPA.9.083	170	97
4	CPA.9.086	36	34
4	CPA.9.089	110	52
4	CPA.9.093	80	60
4	CPA.9.101	130	22
4	CPA.9.103	95	30

Фиг. 52

Что именно	Последовательность	SEQ ID NO:
Варибельный домен тяжелой цепи (vH)	EVQLVETGGGLIQGRSLRLSCAASGFTSSYAMHWVRQAPGKLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYGMDVWGQGTITVSS	160
vHCDR1	GFTSSYA	161
vHCDR2	ISYAGEVK	162
vHCDR3	ARDPLPLHYGMDV	163
Полноразмерная HC (IgG4(S241P))	EVQLVETGGGLIQGRSLRLSCAASGFTSSYAMHWVRQAPGKLEWVAVISYAGEVKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARDPLPLHYGMDVWGQGTITVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSIVVTPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPAPAEFLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVDQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNK GLPSSIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFLYSRL TVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	164
Варибельный домен легкой цепи (vL)	QSALTQPRASGNPGQRTVISCSSSNMGRRPVNWYQIQPGTAPKLLIYSQNRPSGVPDRFSGSQSGTSASLTISGLQSE DEAEYFCVWDDIGRVLQLGGGTQLAVLG	165
vLCDR1	SSNMGRRP	166
vLCDR2	SQN	167
vLCDR3	AVWDDIGRVLQ	168
Полноразмерная легкая цепь	QSALTQPRASGNPGQRTVISCSSSNMGRRPVNWYQIQPGTAPKLLIYSQNRPSGVPDRFSGSQSGTSASLTISGLQSE DEAEYFCVWDDIGRVLQLGGGTQLAVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVE TTTPSKQSNKNKYAASSYLSLTPEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	169

Фиг. 53A; CPA.9.086

040773

Что именно	Последовательность	SEQ ID NO:
Варибельный домен тяжелой цепи (vh)	EVQLVETGGGLIQGRSLRLSCAASGFTSSYAMHWVRQAPGKLEWVAVISYDGPVYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARDPLPHYGYMDVWGQGTITVTVSS	150
vhCDR1	GFTSSYA	151
vhCDR2	ISYDGPV	152
vhCDR3	ARDPLPHYGYMDV	153
Полноразмерная HC (IgG4(S241P))	EVQLVETGGGLIQGRSLRLSCAASGFTSSYAMHWVRQAPGKLEWVAVISYDGPVYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARDPLPHYGYMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGKITYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTPREEQFNSTYRVSVLTVHLQDVLNGKEYCKVSNK GLPSSIEKTSKAGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSGFFLYSLR TVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	154
Варибельный домен легкой цепи (vl)	QSALTQPRASGNPGQRTVITSCGSSNMGRRPVNWYQQIPGTAPKLLIYSQNPORPSGVPRDFSGSGTSASLTISGLQSE DEAEYFCAVWDGDRRLSLQGGGTQLAVLG	155
vlCDR1	SSNMGRRP	156
vlCDR2	SQN	157
vlCDR3	AVWDGDRRLSLQ	158
Полноразмерная легкая цепь	QSALTQPRASGNPGQRTVITSCGSSNMGRRPVNWYQQIPGTAPKLLIYSQNPORPSGVPRDFSGSGTSASLTISGLQSE DEAEYFCAVWDGDRRLSLQGGGTQLAVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGV ETTPPKSQSNKNAASSYSLTPEQWKSHRYSYSCQVTEGSTVEKTVAPTECS	159

Фиг. 53B; CPA.9.083

Что именно	Последовательность	SEQ ID NO:
Варибельный домен тяжелой цепи (vh)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYIMSWVRQAPGKLEWVATISGGGTNTYYADSVKGRFTISRDNKSN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYAMDYWGQGTITVTVSS	560
vhCDR1	GFTSSYIMS	561
vhCDR2	TISGGTNTY	562
vhCDR3	WLLSYAMDY	563
Полноразмерная HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYIMSWVRQAPGKLEWVATISGGGTNTYYADSVKGRFTISRDNKSN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWLLSYAMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGKITYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTPREEQFNSTYRVSVLTVHLQDVLNGKEYCKV SNKGLPSSIEKTSKAGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSGFFLY SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	564
Варибельный домен легкой цепи (vl)	DIQMTQSPSSLSASVGDRITITCRASQINIVWLSWYQQKPKGKAPKLLIYKASKSHTGVPSRFSGSGSDFTLTIS LQPEDFATYYCQGGQSYPTFGQGTLEIK	565
vlCDR1	RASQINIVWLS	566
vlCDR2	KASKSHT	567
vlCDR3	QGGQSYPT	568
Полноразмерная легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGDRITITCRASQINIVWLSWYQQKPKGKAPKLLIYKASKSHTGVPSRFSGSGSDFTLTIS LQPEDFATYYCQGGQSYPTFGQGTLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWVKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSITYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	569

Фиг. 53A: CHA.9.547.13

Антитело	Дата	K _D ± 95 %-доверительный интервал аппроксимации
BM26	12/12/2016	490 пкМ±80 пМ
BM29	12/12/2016	760 пкМ±180 пМ
CPA.9.027	10/18/2016	170 пкМ±40 пМ
CPA.9.049	7/21/2016	260 пкМ±170 пМ
CPA.9.059	10/18/2016	290 пкМ±110 пМ
CHA.9.536	12/12/2016	880 пкМ±260 пМ
CHA.9.541	12/12/2016	1.24 нМ±470 пМ
CHA.9.543	12/12/2016	10.2 нМ±3.27 нМ
CHA.9.546	12/12/2016	1.22 пкМ±390 пМ
CHA.9.547	12/12/2016	720 пкМ±200 пМ
CHA.9.560	12/12/2016	1.02 нМ±210 пМ

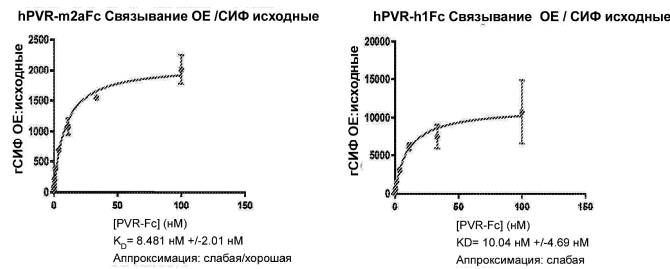
Фиг. 54

Антитело	Дата	$K_D \pm 95$ %-доверительный интервал аппроксимации
BM26	12/12/2016	670 пМ±240 пМ
BM29	12/12/2016	Ненадежная аппроксимация
CPA.9.027	10/18/2016	2.25 нМ±760 пМ
CPA.9.049	7/21/2016	1.88 нМ±1.09 нМ
CPA.9.059	9/2/2016	Нет связывания
CHA.9.536	12/12/2016	2.15 нМ±590 пМ
CHA.9.541	12/12/2016	2.09 нМ±280 пМ
CHA.9.543	12/12/2016	17.2 нМ±3.82 нМ
CHA.9.546	12/12/2016	1.36 нМ±270 пМ
CHA.9.547	12/12/2016	1.4 нМ±390 пМ
CHA.9.560	12/12/2016	1.84 нМ±140 пМ

Фиг. 55

МКАТ	TIGIT человека			TIGIT яваньского макака			TIGIT мыши		
	K_d (/s)	k_d (/M·s)	K_D (M)	K_d (/s)	k_d (/M·s)	K_D (M)	K_d (/s)	k_d (/M·s)	K_D (M)
CPA.9.027	1.94E+05	2.51E-04	1.30E-10	Комплексная кинетика			4.50E+05	3.60E-02	8.00E-08
CPA.9.049	1.68E+06	1.58E-04	9.45E-11	Комплексная кинетика			4.65E+05	3.85E-02	8.27E-08
CPA.9.059	1.88E+06	4.01E-05	2.13E-11	Комплексная кинетика			Н/Д		
CHA.9.536	8.81E+05	*1.00E-05	1.13E-11	1.18E+06	2.90E-04	2.45E-10	Нет связывания		
CHA.9.541	4.51E+05	3.64E-05	8.08E-11	1.75E+06	*1.00E-05	5.73E-12	Нет связывания		
CHA.9.543	1.97E+06	4.54E-05	2.31E-11	6.46E+06	*1.00E-05	1.55E-12	Нет связывания		
CHA.9.546	1.19E+06	2.68E-04	2.26E-10	2.20E+06	1.23E-03	5.56E-10	Нет связывания		
CHA.9.547	2.69E+06	1.03E-04	3.84E-11	3.34E+06	5.15E-04	1.54E-10	Нет связывания		
CHA.9.560	1.04E+06	1.59E-06	*1.52E-12	3.05E+06	1.90E-04	6.23E-11	Нет связывания		
BM26	2.05E+06	4.94E-05	2.41E-11	7.99E+06	*1.00E-05	1.25E-12	Нет связывания		
BM29	1.63E+06	2.45E-05	1.5E-11	Комплексная			Нет связывания		

Фиг. 56



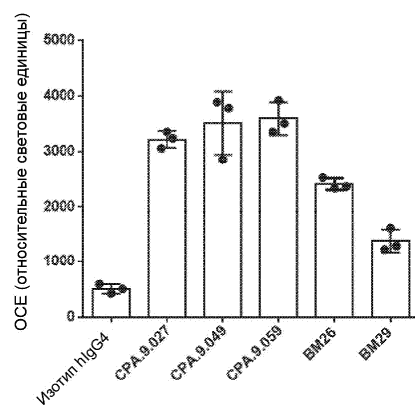
Фиг. 57А-В

Антитело	6,7 нМ мКАТ		1,3 нМ мКАТ		266 пМ мКАТ	
	Блокирование (да/нет)	гСИФ	Блокирование (да/нет)	гСИФ	Блокирование (да/нет)	гСИФ
BM26	Да	234	Да	401	Да	719
Синагис	Нет	828	Нет	964	Нет	959
CPA.9.027	Да	208	Да	253	Да	529
CPA.9.049	Да	215	Да	276	Да	511
CPA.9.059	Да	209	Да	262	Да	509

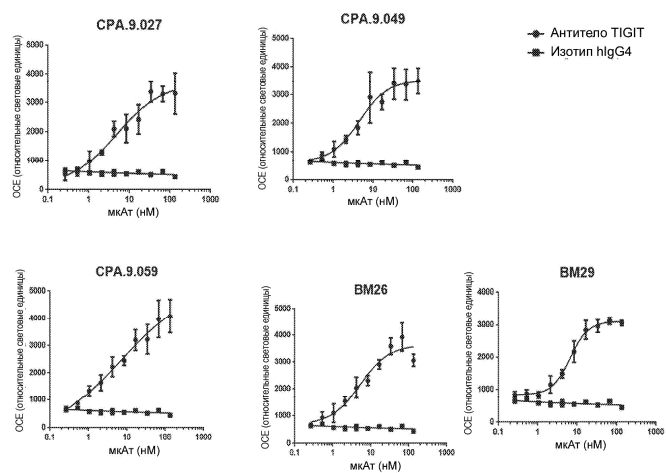
Фиг. 58

Антитело	Дата тестирования	ИК50 (нМ)
BM26	12/10/2016	0.37
BM29	12/10/2016	0.60
СНА.9.536	12/10/2016	0.92
СНА.9.541	12/10/2016	1.24
СНА.9.546	12/10/2016	0.63
СНА.9.547	12/10/2016	0.49
СНА.9.560	12/10/2016	1.12

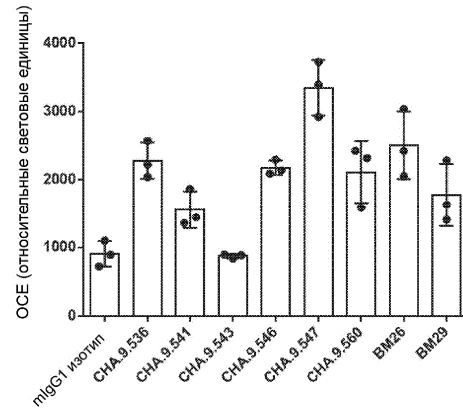
Фиг. 59



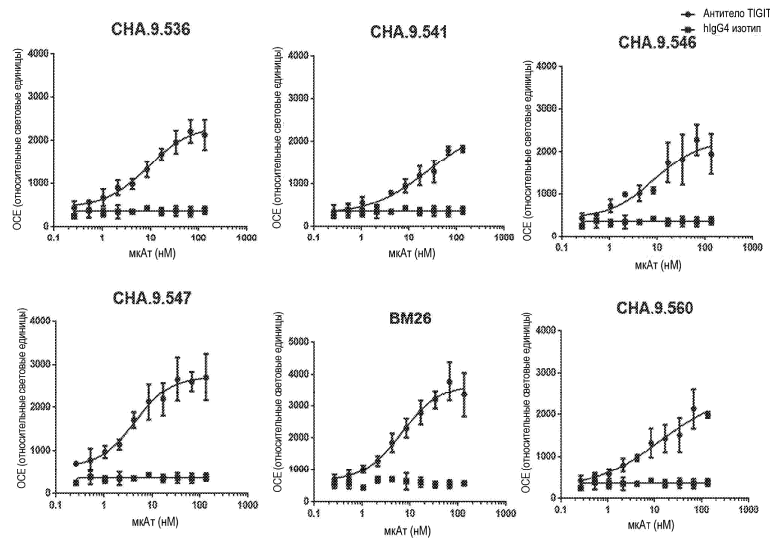
Фиг. 60



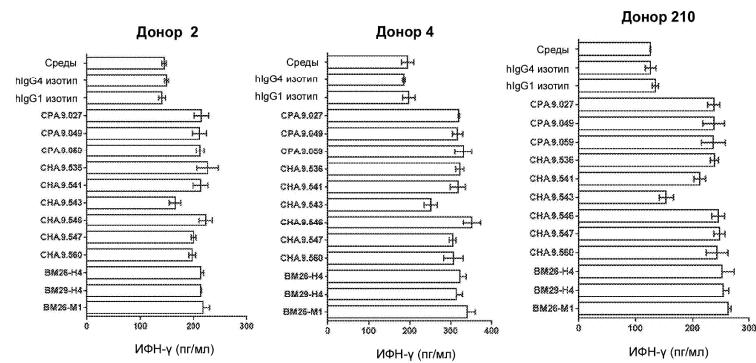
Фиг. 61



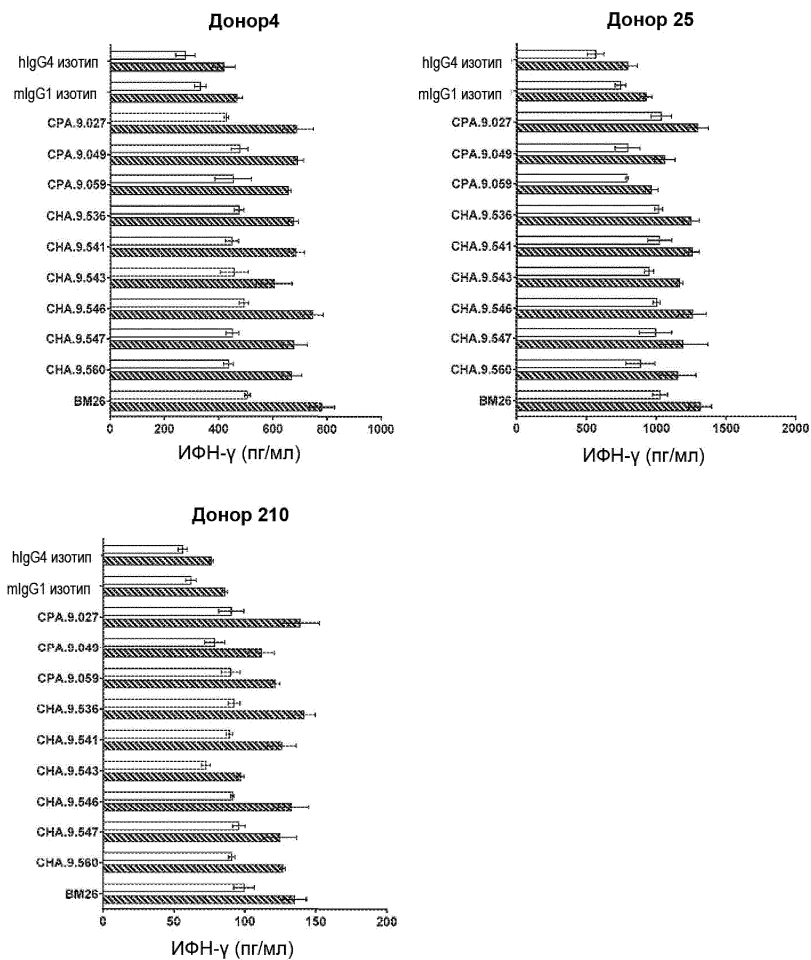
Фиг. 62



Фиг. 63



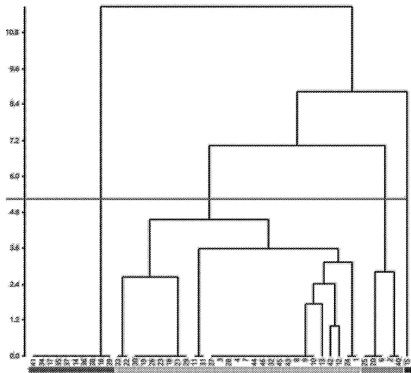
Фиг. 64



Фиг. 65

	Среднее из 3 доноров	
	Монотерапия	Комбо с СНА.7.518.1
СНА.7.518.1+hlgG4 изотип ..	43	102
СРА.9.027-Н4	66	112
СРА.9.049-Н4	51	108
СРА.9.059-Н4	55	108
СНА.7.518.1+mlgG1 изотип ..	39	100
СНА.9.536-М1	43	93
СНА.9.541-М1	39	65
СНА.9.543-М1(неблокирующее)	27	103
СНА.9.546-М1	43	96
СНА.9.547-М1	47	94
СНА.9.560-М1	38	107
BM26	49	

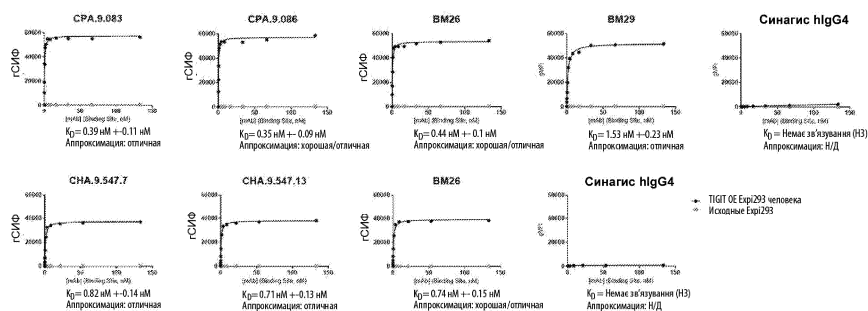
Фиг. 66



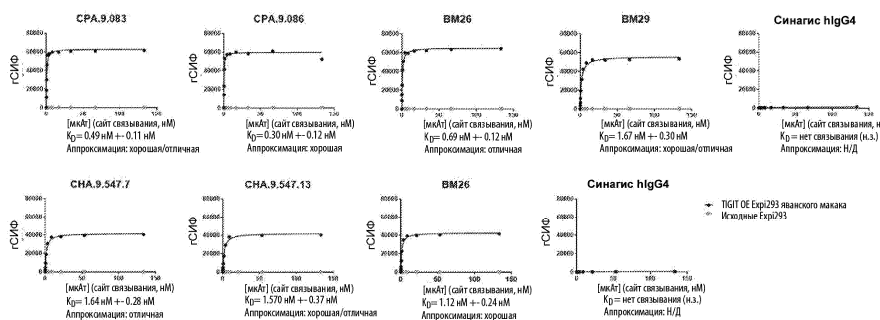
Фиг. 67

41 BM9-H4 34 CHA.9.525 17 CPA.9.081-H4 35 CHA.9.538 37 CHA.9.553 14 CPA.9.069-H4 36 CHA.9.543 38 CHA.9.556 16 CPA.9.077-H4 38 CHA.9.561	33 CHA.9.580 22 CHA.9.528 30 CHA.9.552 19 CHA.9.521 26 CHA.9.541 23 CHA.9.529 18 CHA.9.519 21 CHA.9.527 29 CHA.9.549 11 CPA.9.057-H4 31 CHA.9.554	27 CHA.9.546 3 CPA.9.012-H4 28 CHA.9.547 4 CPA.9.013-H4 7 CPA.9.018-H4 44 MB5A43-M1 46 Sino PVR-Fc (лиганд) 32 CHA.9.555 45 PVR-Fc M2A (лиганд) 43 BM29-H4 8 CPA.9.027-H4 9 CPA.9.049-H4 20 CPA.9.053-H4 13 CPA.9.064-H4 42 BM26-H4 12 CPA.9.059-H4 24 CHA.9.535 1 CPA.9.009-H4	25 CHA.9.536 20 CHA.9.522 6 CPA.9.015-H4 2 CPA.9.011-H4 40 BM5-H4 15 CPA.9.071-H4
--	---	--	--

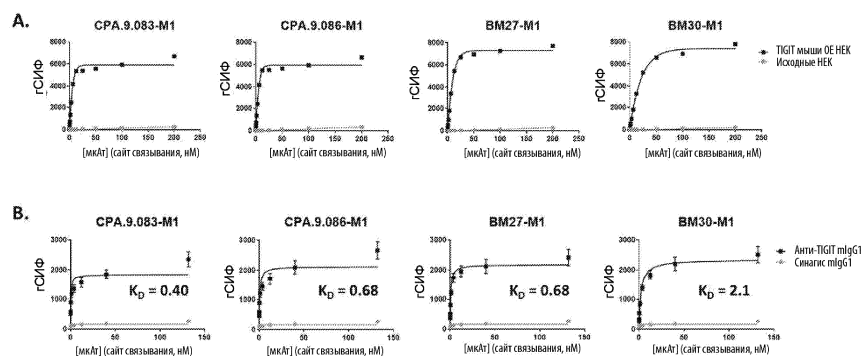
Фиг. 68



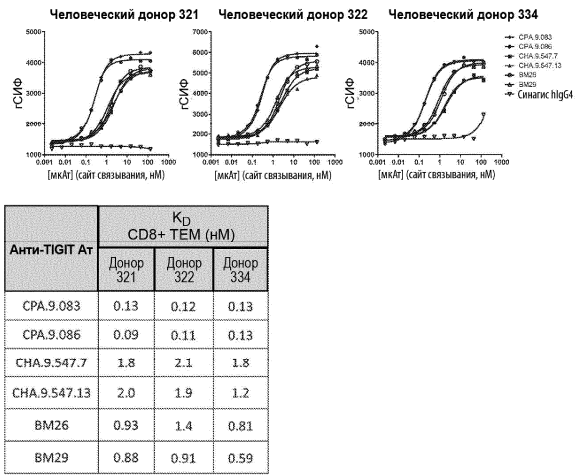
Фиг. 69



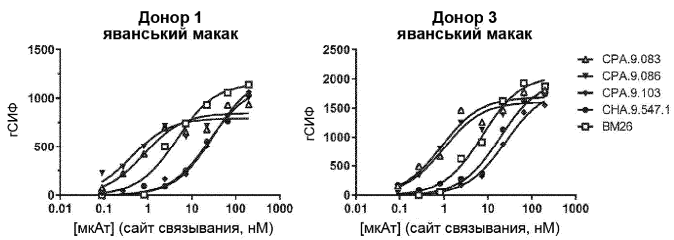
Фиг. 70



Фиг. 71



Фиг. 72

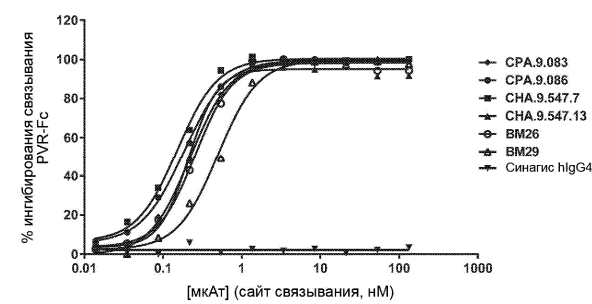


Анти-TIGIT Ат	K _D CD8+ Тем Донор 1 (нМ)	K _D CD8+ Тем Донор 3 (нМ)
CRA.9.083	0.82	0.88
CRA.9.086	0.43	0.98
CRA.9.103	31	25
CHA.9.547.1	25	19
BM26	4.6	7.5

Фиг. 73

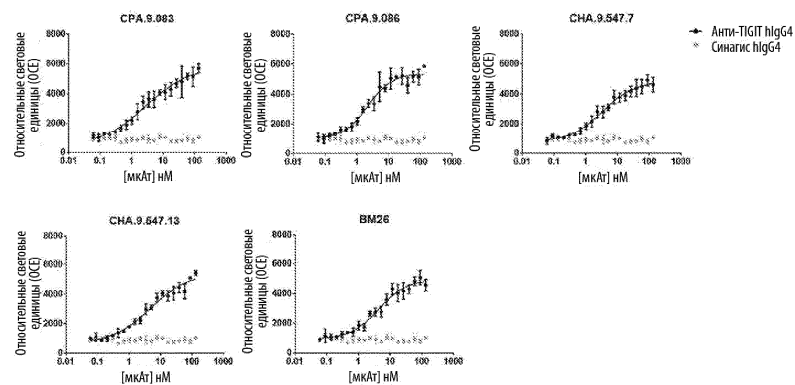
Название	TIGIT-His человека			TIGIT-His яванского макака			TIGIT-His мыши		
	k _{on} /с	K _d (/М-с)	K _D (нМ)	k _{on} /с	K _d (/М-с)	K _D (нМ)	k _{on} /с	K _d (/М-с)	K _D (нМ)
CRA.9.083	6.00E+06	1.00E-05	1.7	Комплексная кинетика			2.73E+06	1.19E-03	434
CRA.9.086	4.40E+06	1.00E-05	2.3	Комплексная кинетика			1.83E+06	1.21E-03	663
CRA.9.103	2.48E+06	1.60E-05	6.4	1.63E+06	5.50E-04	337	1.60E+07	0.4	25,000
CHA.9.547.1	2.47E+06	2.42E-04	98	1.03E+06	1.17E-03	1131	Нет связывания		
CHA.9.547.7	1.60E+06	5.51E-05	35	7.45E+05	3.40E-04	456	Нет связывания		
BM26	2.50E+06	1.00E-05	4.0	2.83E+06	1.00E-05	3.5	Нет связывания		
BM29	9.10E+05	1.00E-05	11	3.45E+06	5.30E-03	1537	Нет связывания		

Фиг. 74

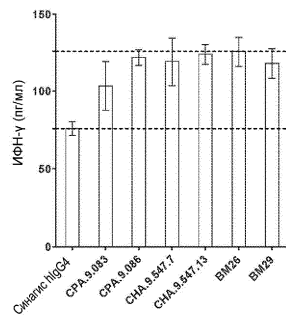
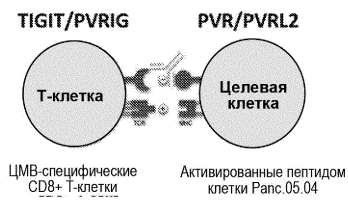


Анти-TIGIT Ат	ИК ₅₀ сайт связывания (нМ), n=1	ИК ₅₀ сайт связывания (нМ), n=2
CRA.9.083	0.47	0.22
CRA.9.086	0.36	0.18
CHA.9.547.7	0.21	0.15
CHA.9.547.13	0.26	0.21
BM26	0.45	0.26
BM29	1.0	0.50

Фиг. 75

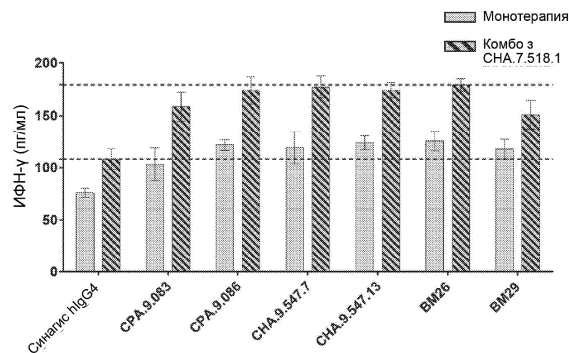


Фиг. 76



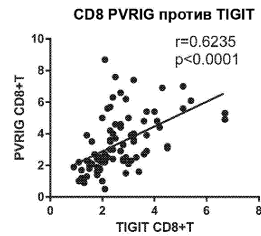
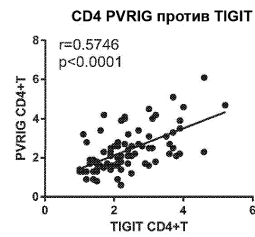
	Донор 4 (n=1)	Донор 4 (n=2)
CPA.9.083	36	111
CPA.9.086	60	100
CHA.9.547.7	57	125
CHA.9.547.13	63	108
BM26	65	84
BM29	55	103

Фиг. 77

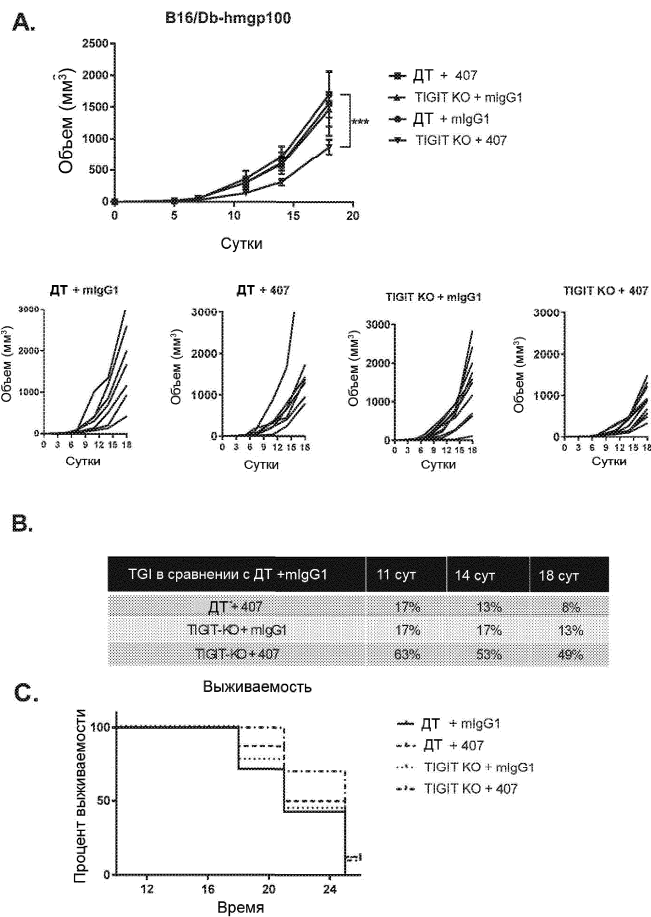


	Донор 4 (n=1)	Донор 4 (n=2)
CPA.9.083	46	149
CPA.9.086	61	115
CHA.9.547.7	64	114
CHA.9.547.13	61	107
BM26	66	88
BM29	39	67

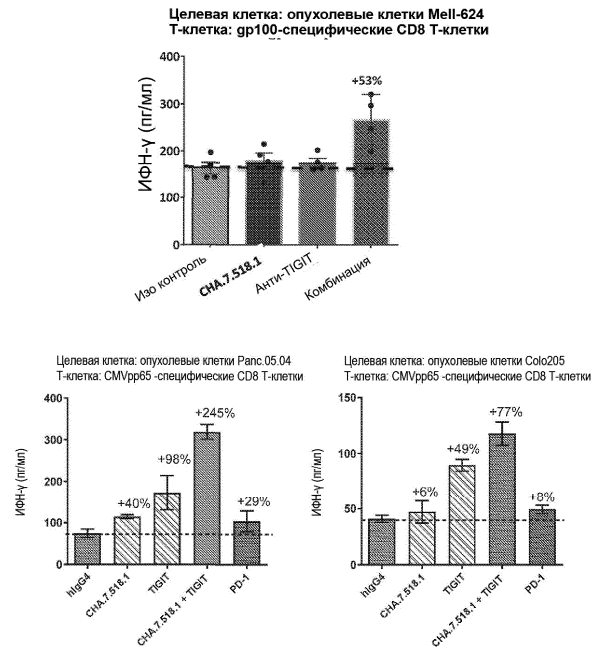
Фиг. 78



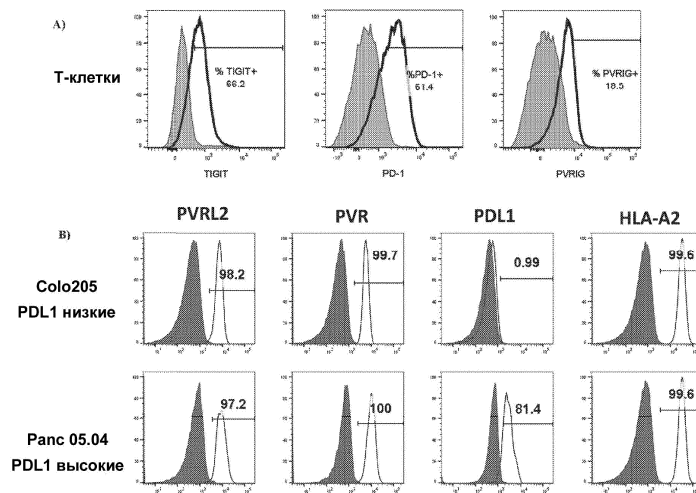
Фиг. 79



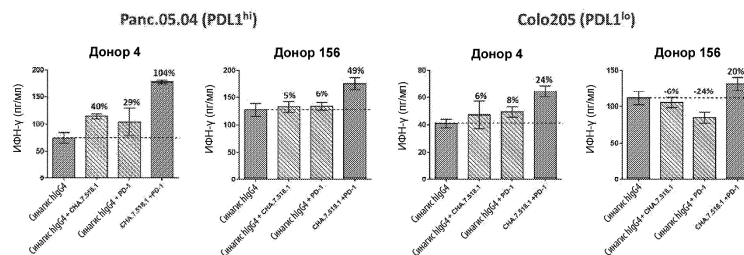
Фиг. 80



Фиг. 81



Фиг. 82А-В

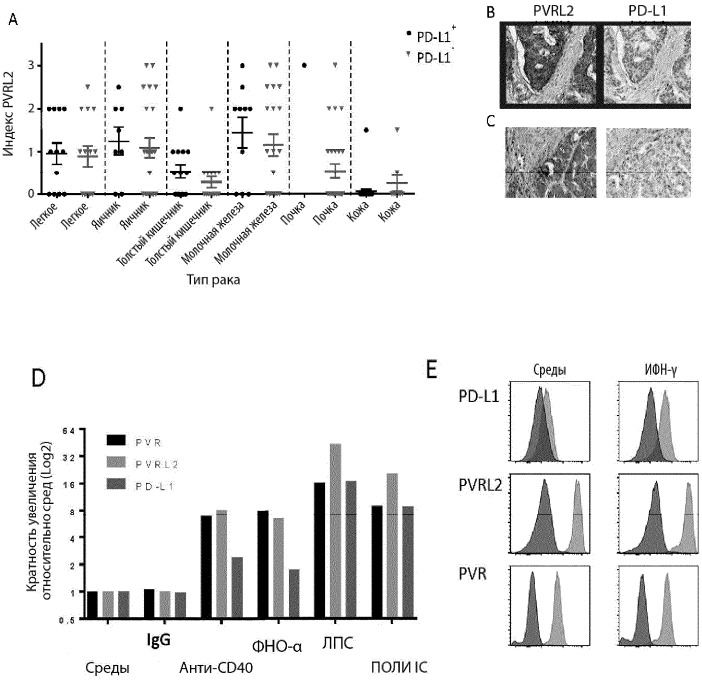


Фиг. 82С

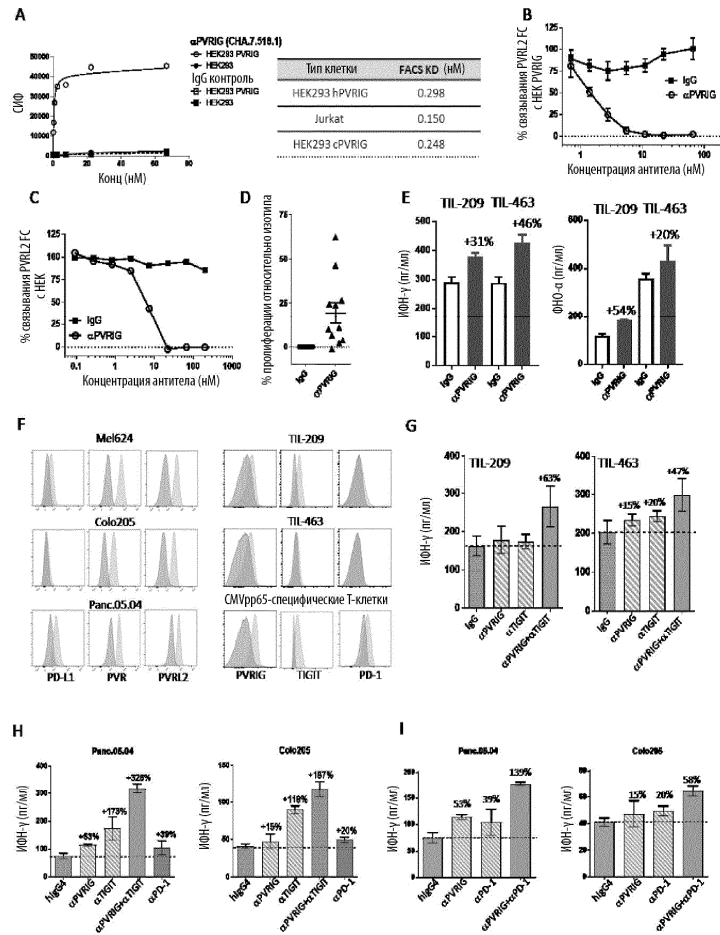


Тип ткани	Все опухоли			PD-L1+			PD-L1-		
	PVRL2+	Общее	% положительных	PVRL2+	Общее	% положительных	PVRL2+	Общее	% положительных
Легкое									
Нормальная ткань	1	4	25	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д
Аденокарцинома	8	14	57	3	5	60	5	9	56
Плоскоклеточная карцинома	8	13	62	5	7	71	3	5	50
Яичник									
Нормальная ткань	0	2	0	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д
Серозная цистаденокарцинома	8	12	67	2	3	67	5	9	67
Муцинозная цистаденокарцинома	4	6	67	1	1	100	3	5	60
Эндометриальная аденокарцинома	8	12	67	3	4	75	5	8	63
Толстый кишечник									
Нормальная ткань	0	2	0	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д
Аденокарцинома	16	30	53	8	14	57	7	16	44
Шкура									
Нормальная ткань	0	4	0	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д
Первичная меланома	3	24	13	1	4	25	2	20	10
Метастатическая карцинома	1	12	8	1	4	25	0	8	0
Печеная									
Нормальная ткань	0	3	0	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д
Светлоклеточный рак	8	20	40	0	0	Н/Д	8	20	40
Пигментный почечно-клеточный рак	2	7	29	1	1	100	1	5	17
Молочная железа									
ТНБС	1	3	33	0	0	Н/Д	1	3	33
Инфильтративно-протоковая карцинома	19	30	63	6	10	60	13	20	65

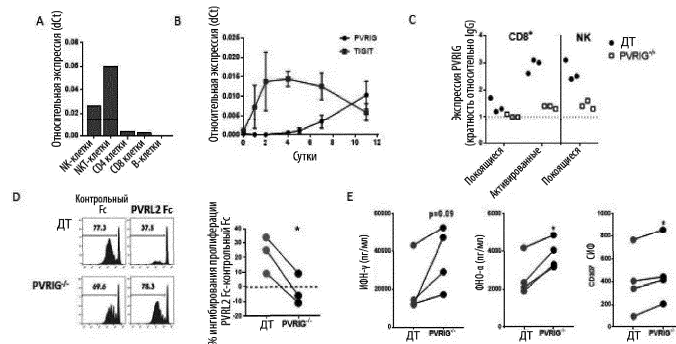
Фиг. 84F



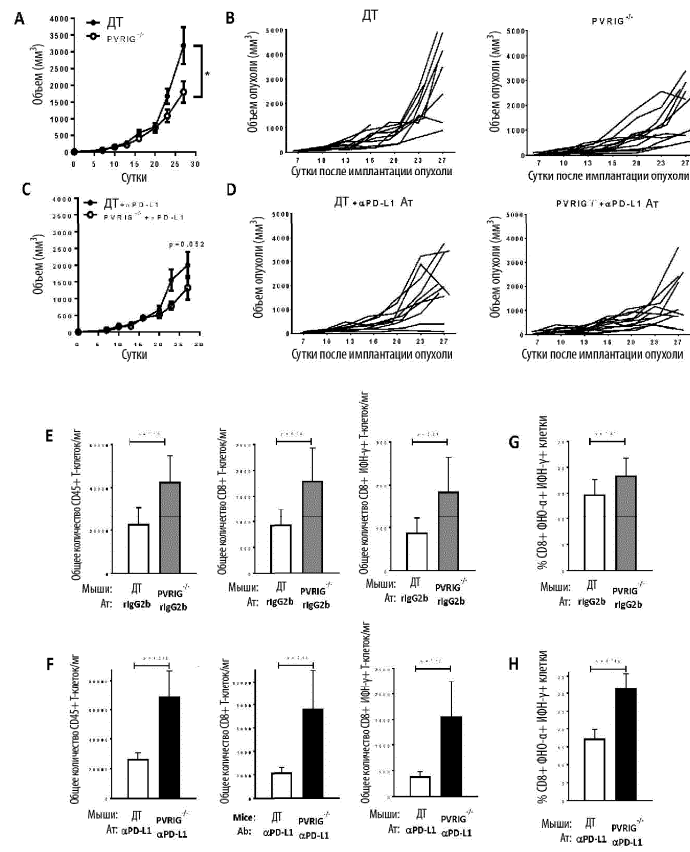
Фиг. 85



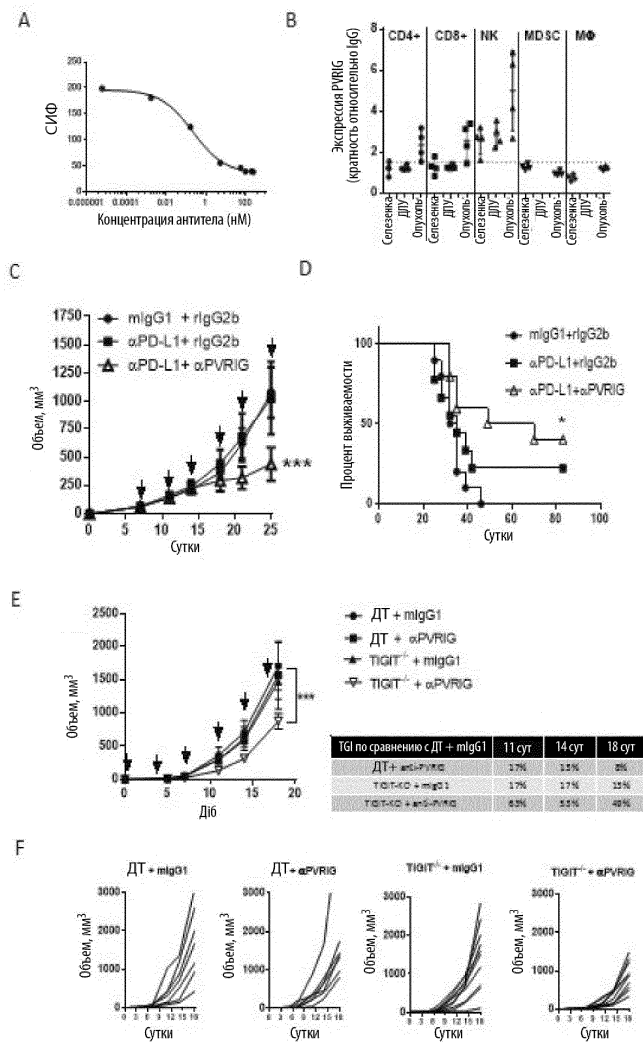
Фиг. 86



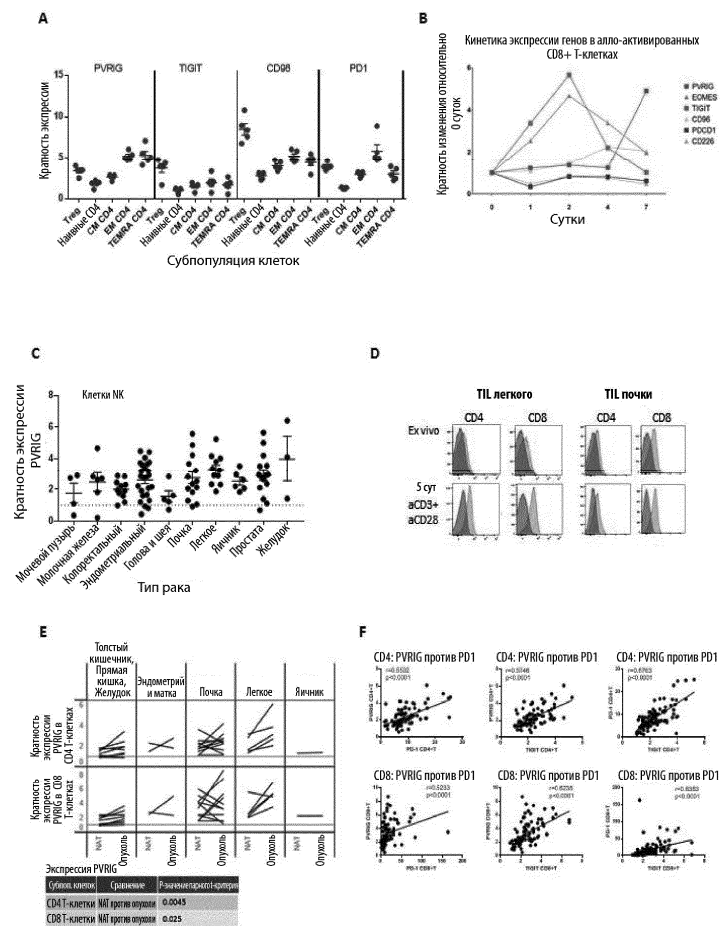
Фиг. 87



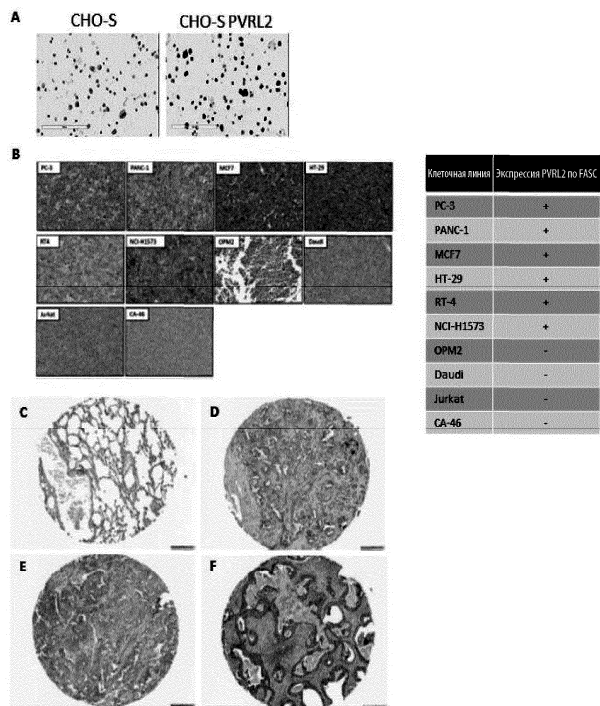
Фиг. 88



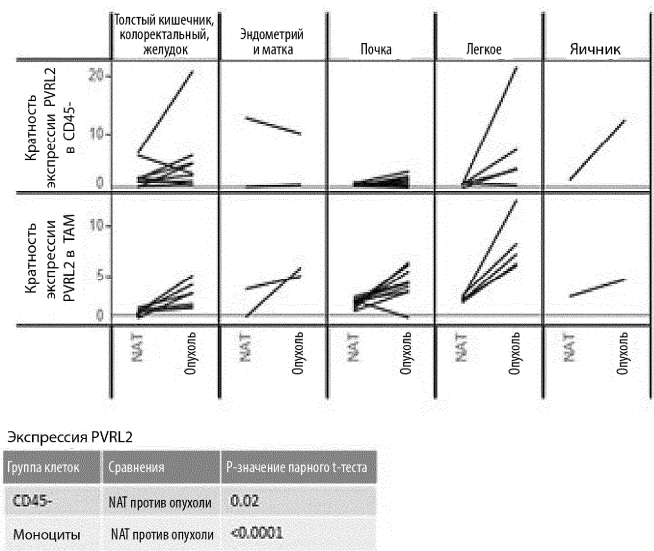
Фиг. 89



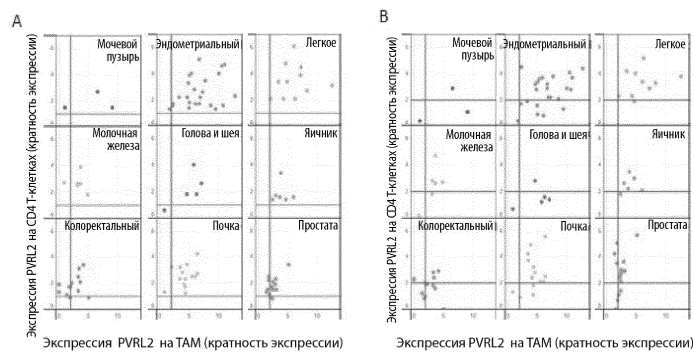
Фиг. 90



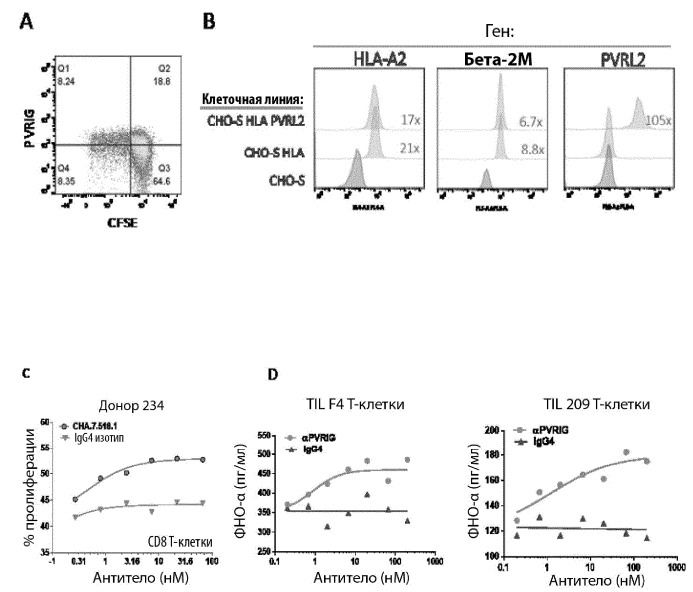
Фиг. 91



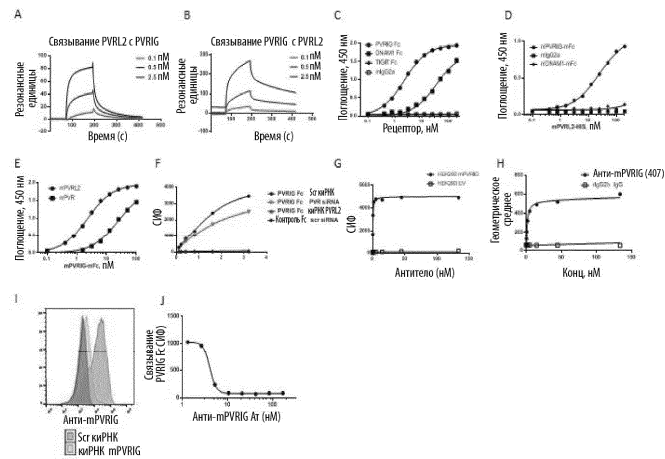
Фиг. 92



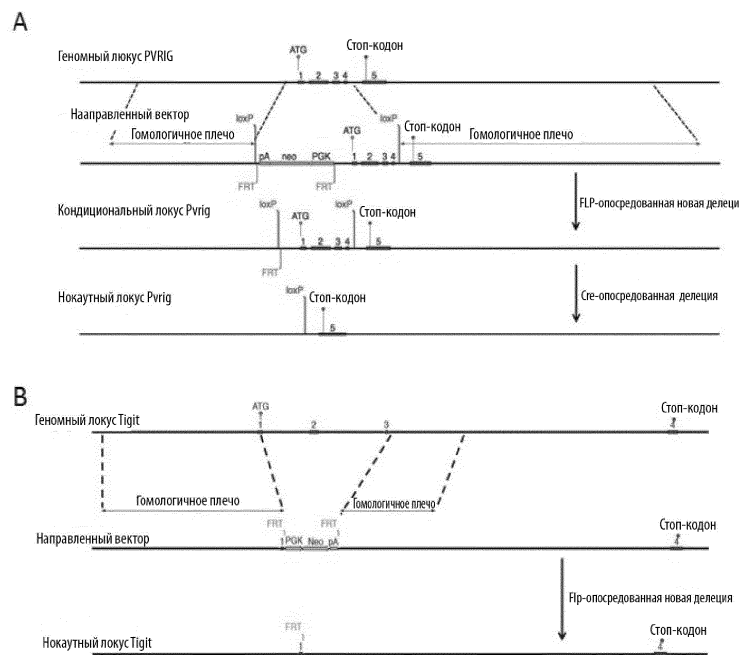
Фиг. 93



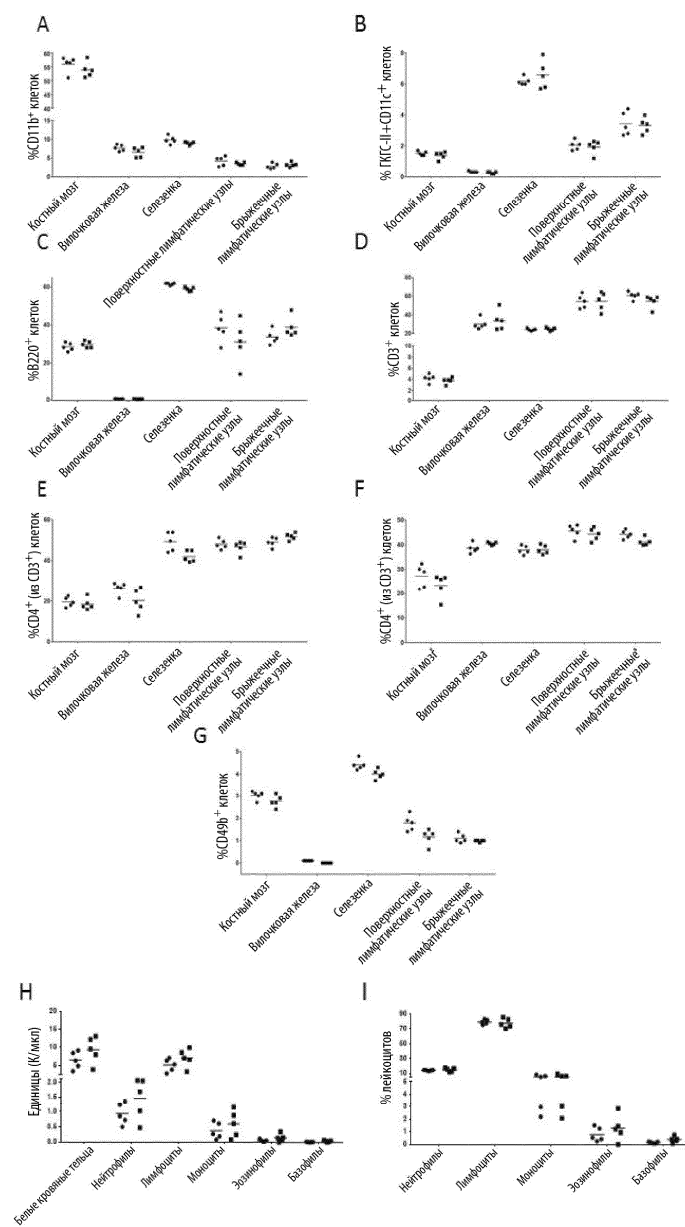
Фиг. 94



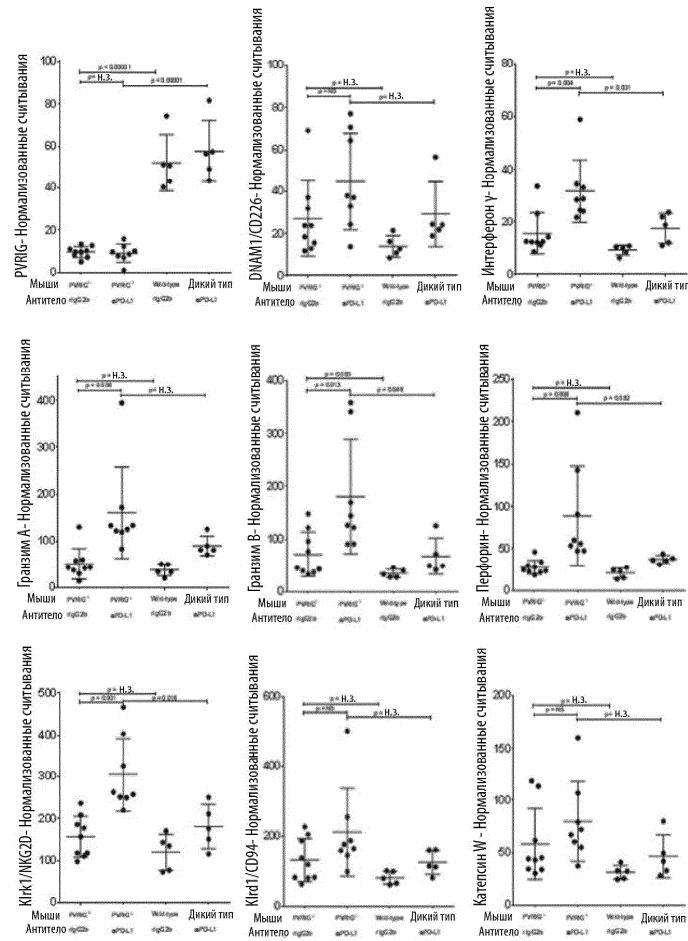
Фиг. 95



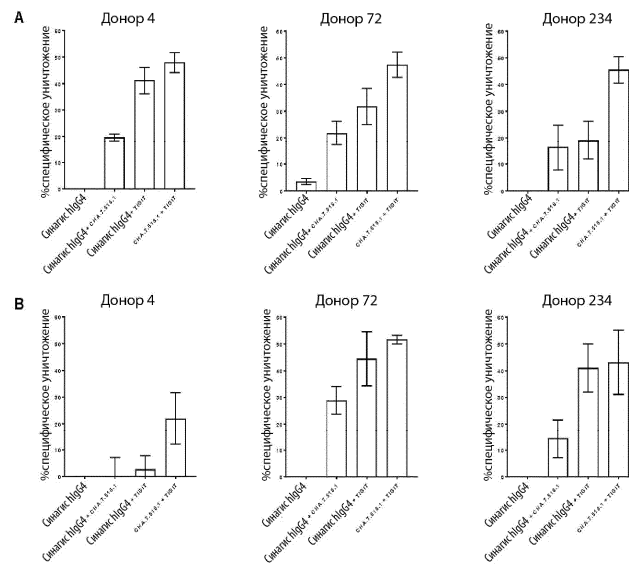
Фиг. 96



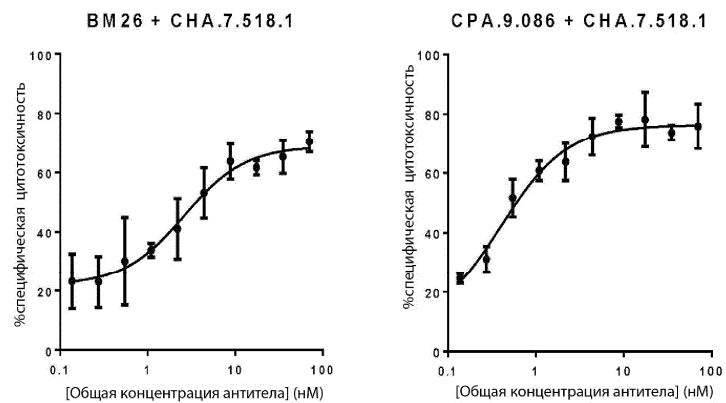
Фиг. 97



Фиг. 98



Фиг. 99

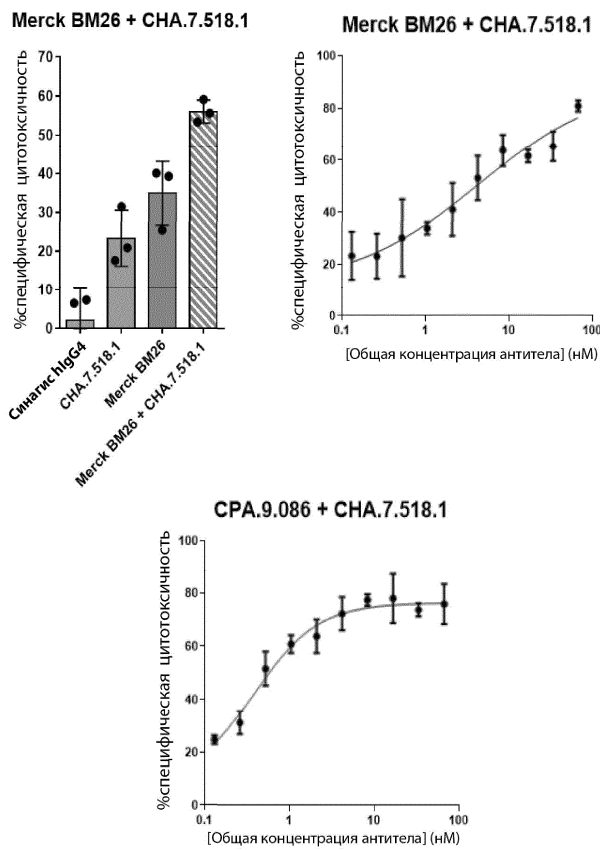


Фиг. 100

Последовательности CDR CPA9.086

Определение	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3
IMGT	GFTESSYA (SEQ ID NO:600)	ISYAGEVK (SEQ ID NO:601)	ARDPLPLHYVGMDV (SEQ ID NO:602)	SSNMGRRP (SEQ ID NO:603)	SGN (SEQ ID NO:604)	AVWDDIGRVLQ (SEQ ID NO:605)
Кабат	SYAMH (SEQ ID NO:606)	VISYAGEVKYADSVKG (SEQ ID NO:607)	DPLPLHYVGMDV (SEQ ID NO:608)	SGSSNMGRRPVN (SEQ ID NO:609)	SGNQRP (SEQ ID NO:610)	AVWDDIGRVLQ (SEQ ID NO:611)

Фиг. 101



Фиг. 102

