

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041301**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.10.05

(21) Номер заявки
201891989

(22) Дата подачи заявки
2017.03.03

(51) Int. Cl. **A61K 39/00** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА К TIGIT

(31) 62/304,045; 62/413,025

(32) 2016.03.04; 2016.10.26

(33) US

(43) 2019.04.30

(86) PCT/US2017/020719

(87) WO 2017/152088 2017.09.08

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ДЖН БАЙОСАЙЕНСИЗ, ЛЛК;
АБМУНО ТЕРАПЬЮТИКС ЛЛК (US)

(72) Изобретатель:
Тсо Дж. Юнь, Цурусита Наоя,
Дурамад Омар (US)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) WO-A1-2016011264
STENGEL et al.: "Structure of TIGIT Immunoreceptor Bound To Poliovirus Receptor Reveals A Cell-Cell Adhesion And Signaling Mechanism That Requires Cis-Trans Receptor Clustering" Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012, Vol. 109, No. 14, pp 5399-5404; abstract; page 5400, second column, second paragraph, www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1120606109/-/DCSupplemental.
WO-A2-2012078793
US-A1-20110150903
WO-A1-2016028656

(57) Изобретение обеспечивает моноклональные антитела, которые специфически связываются с TIGIT. Моноклональные антитела обладают способностью к усиленной активации Т-клеток и природных киллерных клеток путем ингибирования связывания TIGIT с CD155. Моноклональные антитела можно использовать для лечения злокачественного новообразования и инфекционного заболевания среди прочих применений.

B1

041301

041301
B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет временной патентной заявки США № 62/304045, поданной 4 марта 2016 г., и временной патентной заявки США № 62/413025, поданной 26 октября 2016 г., описание которых включено в настоящую заявку посредством ссылки во всей их полноте.

Область техники, к которой относится изобретение

В настоящей заявке представлены, *inter alia*, моноклональные антитела, которые специфически связываются с молекулами иммунных контрольных точек, таким образом, приводя к существенной активации иммунных клеток, а также применение таких антител для лечения злокачественного новообразования и инфекционного заболевания, среди прочего.

Уровень техники

Антигенспецифический иммунный ответ представляет собой сложный биологический процесс, который контролируется несколькими уровнями положительных и отрицательных регуляторов. Т-клетки изначально стимулируются через Т-клеточный рецептор (TCR) путем распознавания их когнатного пептидного антигена, презентированного молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС) на антиген-презентирующих клетках. Для оптимальной Т-клеточной активации требуется "второй сигнал", обеспечиваемый коstimуляторными молекулами, такими как CD28. Иммунный ответ затем положительно регулируется коstimуляторными молекулами, такими как OX40, GITR и 4-1BB, которые относятся к суперсемейству рецепторов TNF, и отрицательно регулируется молекулами контрольных точек, такими как PD-1 и CTLA-4. Функция молекул контрольных точек заключается в предотвращении нежелательной чрезмерной реакции иммунной системы в организме; однако, они также ограничивают способность иммунной системы эффективно бороться со злокачественными новообразованиями и инфекционным заболеванием. Сообщалось о том, что блокирование функции PD-1 или CTLA-4 антагонистическим моноклональным IgG антителом эффективно для иммунотерапии злокачественных новообразований у людей (см. обзор Pardoll, *Nat. Rev. Cancer*, 12:252-264, 2012; Mahoney et al., *Nat. Rev. Drug Discov.* 14:561-584, 2015; Shin et al., *Curr. Opin. Immunol.* 33:23-35, 2015; Marquez-Rodas et al. *Ann. Transl. Med.* 3:267, 2015).

Сообщалось о других молекулах контрольных точек, таких как TIM-3, LAG-3, TIGIT, BTLA и VISTA (Mercier et al., *Front. Immunol.* 6:418, 2015). TIGIT (Т-клеточный иммунорецептор с Ig и ITIM доменами), член суперсемейства иммуноглобулинов с иммунорецепторным ингибиторным мотивом на основе тирозина (ITIM) в цитоплазматическом концевом сегменте, экспрессируется на подгруппах активированных Т-клеток и природных киллерных (NK) клеток (Yu et al., *Nat. Immunol.* 10:48-57, 2009). Известно, что TIGIT взаимодействует с CD155 (также называемым PVR и неcl-5), CD112 (также называемым PVRL2 и нектин-2) и возможно CD113 (также называемым PVRL3 и нектин-3) (Mercier et al., *supra*; Martinet et al., *Nat. Rev. Immunol.* 15:243-254, 2015). Сообщалось, что связывание TIGIT с высокоаффинными лигандами CD155, которые экспрессируются на антигенпрезентирующих клетках, подавляет функцию Т-клеток и NK клеток (Mercier et al., *supra*; Joller et al., *J. Immunol.* 186: 1338-1342, 2011; Staniet-sky et al., *Eur. J. Immunol.* 43:2138-2150, 2013; Li et al., *J. Biol. Chem.* 289:17647-17657, 2014; Zhang et al. *Cancer Immunol. Immunother.* Epub on Feb. 3, 2016). Также сообщалось, что TIGIT ингибирует Т-клетки опосредованно путем модуляции продукции цитокинов дендритными клетками (Yu et al., *supra*).

Опухоли создают высокосупрессивное микроокружение, где инфильтрирующие Т-клетки истощаются и NK клетки подавляются молекулами контрольных точек, такими как PD-1 и TIGIT, для уклонения от иммунных ответов (Johnston et al., *Cancer Cell.* 26:926-937, 2014; Chauvin et al., *J. Clin. Invest.* 125:2046-2058, 2015; Inozume et al., *J. Invest. Dermatol.* Epub on Oct 12, 2015). Как сообщалось, высокий уровень экспрессии TIGIT на CD8+ Т-клетках коррелирует с плохим клиническим результатом у пациентов с AML (Kong et al., *Clin. Cancer Res.* Epub on Jan. 13, 2016). Функциональные дефекты истощенных TIGIT+ CD8+ Т-клеток у пациентов с AML, как сообщалось, обратимы при миРНК-опосредованном нокдауне экспрессии TIGIT (Kong et al., *supra*). Также сообщалось, что эффекторные CD8+ Т-клетки при инфекции ВИЧ в крови и инфекции ВСГ (вирус свиного гриппа) в лимфоидной ткани демонстрируют более высокие уровни TIGIT (Chew et al., *PLOS Pathogens*, 12:e1005349, 2016). Кроме того, сообщалось, что *ex vivo* блокирование TIGIT антителом восстанавливает вирус-специфические CD8+ Т-клеточные эффекторные ответы.

Раскрытие сущности изобретения

Изобретение относится к *inter alia* антителу, которое конкурирует с любым из TIG1, TIG2 или TIG3 за связывание с TIGIT человека. Антитело TIG1 характеризуется зрелой вариабельной областью легкой цепи SEQ ID NO: 14 и зрелой вариабельной областью тяжелой цепи SEQ ID NO: 10, антитело TIG2 характеризуется зрелой вариабельной областью легкой цепи SEQ ID NO: 22 и зрелой вариабельной областью тяжелой цепи SEQ ID NO: 18, и антитело TIG3 характеризуется зрелой вариабельной областью легкой цепи SEQ ID NO: 30 и зрелой вариабельной областью тяжелой цепи SEQ ID NO: 26, для специфического связывания с TIGIT. Некоторые антитела связываются с тем же самым эпитопом на TIGIT человека, что и TIG1, TIG2 или TIG3. Некоторые антитела ингибируют связывание TIGIT человека с CD155. Некоторые антитела включают три CDR легкой цепи и три CDR тяжелой цепи, по существу из соответствующих трех CDR легкой цепи и трех CDR тяжелой цепи из TIG1. Некоторые антитела включают три CDR легкой цепи и три CDR тяжелой цепи TIG1, TIG2 или TIG3. Некоторые антитела включают три

CDR тяжелой цепи, определенные по номенклатуре Кэбота, и три CDR легкой цепи, определенные по номенклатуре Кэбота, любого из TIG1 (SEQ ID NO: 15-17 легкой цепи и 11-13 тяжелой цепи), TIG2 (SEQ ID NO: 23-25 легкой цепи, 19-21 тяжелой цепи) или TIG3 (SEQ ID NO: 31-33 легкой цепи и 27-29 тяжелой цепи).

Некоторые моноклональные антитела связываются с эпитопом TIGIT человека, содержащим остатки 35 и 37 SEQ NO: 1 и/или остатки 49 и 51 SEQ ID NO: 1. Некоторые моноклональные антитела связываются с эпитопом TIGIT человека, содержащим остатки 35, 37, 49 и 51 SEQ ID NO: 1. Некоторые моноклональные антитела связываются с пептидом, состоящим из остатков 35-51 SEQ ID NO: 1 и не более чем пяти фланкирующих аминокислот из SEQ ID NO: 1 с обеих сторон. Некоторые моноклональные антитела связываются с пептидом, состоящим из остатков 35-51 SEQ ID NO: 1. Некоторые такие моноклональные антитела связываются с эпитопом, состоящим из 3-20 смежных остатков SEQ ID NO: 1.

Некоторые антитела являются химерными, гуманизированными, венеризованными или человеческими. Некоторые антитела имеют IgG1 каппа изотип человека. Некоторые антитела имеют IgG4 каппа изотип человека. Антитело может представлять собой интактное антитело или одноцепочечное антитело, Fab или F(ab')₂ фрагмент.

Изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей любое из указанных выше антител и фармацевтически приемлемый носитель.

Изобретение также относится к способам лечения или осуществления профилактики злокачественного новообразования у пациента, включающим введение пациенту, страдающему злокачественным новообразованием или имеющему повышенный риск развития злокачественного новообразования, любого из указанных выше антител в эффективном режиме. В некоторых способах пациент страдает острым миелоидным лейкозом или Т-клеточным лейкозом взрослых.

В других вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению антител, описанных в настоящей заявке, в комбинации с ингибиторами иммунных контрольных точек. Было показано, что блокада иммунных контрольных точек, которая приводит к амплификации антигенспецифических Т-клеточных ответов, является перспективным подходом в лечении злокачественного новообразования у человека. Примеры иммунных контрольных точек (лигандов и рецепторов), некоторые из которых селективно активируются при регуляции в различных типах опухолевых клеток, которые являются кандидатами для блокады, включают PD-1 (белок запрограммированной клеточной гибели 1); PD-L1 (лиганд запрограммированной клеточной гибели-1); BTLA (В и Т лимфоцитарный аттенуатор); CTLA-4 (антиген 4 цитотоксических Т-лимфоцитов); TIM-3 (Т-клеточный мембранный белок 3); LAG-3 (ген активации лимфоцитов 3); V-доменный иммуноглобулиновый супрессор Т-клеточной активации (VISTA); CD96; A2aR (аденозиновый A2a рецептор); A2bR (аденозиновый A2b рецептор); CD73 (экто-5'-нуклеотидаза); CD39 (ENTPD1, NTPDase1); Аргиназу; индоламин-пиррол 2,3-диоксигеназу (IDO); триптофан 2,3-диоксигеназу (TDO) и ингибирующие рецепторы киллеров. Ингибиторы иммунных контрольных точек и комбинированная терапия с использованием таких ингибиторов обсуждаются подробно в настоящей заявке.

Изобретение также обеспечивает способы лечения индивида, инфицированного патогеном, включающие введение индивиду любого из указанных выше антител в эффективном режиме. В некоторых способах патоген представляет собой ВИЧ или ВСГ. В других способах патоген представляет собой вирусный, бактериальный, грибковый или простейший патоген.

В дополнительных аспектах в настоящей заявке представлено анти-TIGIT антитело, которое связывается с полипептидом TIGIT на одном или нескольких аминокислотных остатках, включающих D51, где полипептид TIGIT имеет аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления любого из вариантов осуществления, раскрытых в настоящей заявке, антитело является химерным, гуманизированным или венеризованным. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой человеческое антитело. В некоторых вариантах осуществления любого из вариантов осуществления, раскрытых в настоящей заявке, антитело не связывается с одним или несколькими аминокислотными остатками, включающими L44, 147 или H55. В некоторых вариантах осуществления любого из вариантов осуществления, раскрытых в настоящей заявке, антитело включает зрелую переменную область легкой цепи SEQ ID NO: 14 и зрелую переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления любого из вариантов осуществления, раскрытых в настоящей заявке, антитело связывается с тем же эпитопом, что и TIG1, в аминокислотной последовательности, соответствующей SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления любого из вариантов осуществления, раскрытых в настоящей заявке, антитело включает три CDR легкой цепи, включающие SEQ ID NO: 15-17, и три CDR тяжелой цепи, включающие SEQ ID NO: 11-13. В некоторых вариантах осуществления любого из вариантов осуществления, раскрытых в настоящей заявке, антитело содержит зрелую переменную область тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 35, и зрелую переменную область легкой цепи, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления зрелая переменная область тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, и зре-

лая переменная область легкой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления любого из вариантов осуществления, раскрытых в настоящей заявке, зрелая переменная область тяжелой цепи связана с константной областью тяжелой цепи, включающей SEQ ID NO: 40, при условии, что С-концевой лизин может присутствовать или не присутствовать, и зрелая переменная область легкой цепи связана с константной областью легкой цепи, включающей SEQ ID NO: 41.

В следующих аспектах в настоящей заявке представлено моноклональное антитело, которое конкурирует с любым из TIG1, TIG2 или TIG3 за связывание с человеческим TIGIT, где антитело TIG1 характеризуется зрелой переменной областью легкой цепи SEQ ID NO: 14 и зрелой переменной областью тяжелой цепи SEQ ID NO: 10, антитело TIG2 характеризуется зрелой переменной областью легкой цепи SEQ ID NO: 22 и зрелой переменной областью тяжелой цепи SEQ ID NO: 18, и антитело TIG3 характеризуется зрелой переменной областью легкой цепи SEQ ID NO: 30 и зрелой переменной областью тяжелой цепи SEQ ID NO: 26, для специфического связывания с CD155. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с тем же самым с эпитопом на человеческом TIGIT, что и любое из TIG1, TIG2 или TIG3. В некоторых вариантах осуществления любого из вариантов осуществления, раскрытых в настоящей заявке, антитело ингибирует связывание CD155 с человеческим TIGIT. В некоторых вариантах осуществления антитело включает три CDR легкой цепи и три CDR тяжелой цепи, соответствующие трем CDR легкой цепи и трем CDR тяжелой цепи любого из TIG1, TIG2 или TIG3. В некоторых вариантах осуществления антитело включает три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи любого из TIG1, TIG2 или TIG3. В некоторых вариантах осуществления антитело включает три CDR тяжелой цепи, определенные по номенклатуре Кэбота, и три CDR легкой цепи, определенные по номенклатуре Кэбота, любого из TIG1 (SEQ ID NO: 15-17 легкой цепи и 11-13 тяжелой цепи), TIG2 (SEQ ID NOs. 23-25 легкой цепи, 19-21 тяжелой цепи) или TIG3 (SEQ ID NO: 31-33 легкой цепи и 27-29 тяжелой цепи). В некоторых вариантах осуществления любого из вариантов осуществления, раскрытых в настоящей заявке, антитело является химерным, гуманизированным или венеризованным. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой человеческое антитело. В некоторых вариантах осуществления любого из вариантов осуществления, раскрытых в настоящей заявке, антитело имеет человеческий IgG1 капса изотип. В некоторых вариантах осуществления любого из вариантов осуществления, раскрытых в настоящей заявке, антитело представляет собой интактное антитело. В некоторых вариантах осуществления любого из вариантов осуществления, раскрытых в настоящей заявке, антитело представляет собой одноцепочечное антитело, Fab или F(ab')₂ фрагмент. В некоторых вариантах осуществления любого из вариантов осуществления, раскрытых в настоящей заявке, антитело содержит зрелую переменную область тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 35, и зрелую переменную область легкой цепи, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления зрелая переменная область тяжелой цепи по меньшей мере на 95 или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 35, и зрелая переменная область легкой цепи по меньшей мере на 95 или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления зрелая переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, и зрелая переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления зрелая переменная область тяжелой цепи связана с константной областью тяжелой цепи, включающей SEQ ID NO: 40, при условии, что С-концевой лизин может присутствовать или не присутствовать, и зрелая переменная область легкой цепи связана с константной областью легкой цепи, включающей SEQ ID NO: 41. В некоторых вариантах осуществления зрелая переменная область тяжелой цепи связана с константной областью тяжелой цепи, включающей SEQ ID NO: 60, при условии, что С-концевой лизин может присутствовать или не присутствовать, и зрелая переменная область легкой цепи связана с константной областью легкой цепи, включающей SEQ ID NO: 64. В некоторых вариантах осуществления зрелая переменная область тяжелой цепи связана с константной областью тяжелой цепи, включающей SEQ ID NO: 61, при условии, что С-концевой лизин может присутствовать или не присутствовать, и зрелая переменная область легкой цепи связана с константной областью легкой цепи, включающей SEQ ID NO: 64. В некоторых вариантах осуществления любого из вариантов осуществления, раскрытых в настоящей заявке, антитело содержит зрелую переменную область тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 43, и зрелую переменную область легкой цепи, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 45. В некоторых вариантах осуществления зрелая переменная область тяжелой цепи по меньшей мере на 95 или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 43, и зрелая переменная область легкой цепи по меньшей мере на 95 или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 45. В некоторых вариантах осуществления зрелая переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, и зрелая переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45. В некоторых вариантах осуществления зрелая переменная область тяжелой цепи связана с константной областью тяжелой цепи, включающей SEQ ID NO: 48, при условии, что С-концевой лизин может присутствовать или не присутствовать, и зрелая переменная область легкой цепи связана с константной областью легкой цепи, вклю-

чающей SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления зрелая переменная область тяжелой цепи связана с константной областью тяжелой цепи, включающей SEQ ID NO: 62, при условии, что С-концевой лизин может присутствовать или не присутствовать, и зрелая переменная область легкой цепи связана с константной областью легкой цепи, включающей SEQ ID NO: 65. В некоторых вариантах осуществления зрелая переменная область тяжелой цепи связана с константной областью тяжелой цепи, включающей SEQ ID NO: 63, при условии, что С-концевой лизин может присутствовать или не присутствовать, и зрелая переменная область легкой цепи связана с константной областью легкой цепи, включающей SEQ ID NO: 65. В некоторых других аспектах в настоящей заявке представлено моноклональное антитело, которое связывается с эпитопом, включающим остатки 35 и 37 SEQ NO: 1 и/или остатки 49 и 51 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с эпитопом, включающим остатки 35, 37, 49 и 51 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с пептидом, состоящим из остатков 35-51 SEQ ID NO: 1 и не более чем пяти фланкирующих аминокислот из SEQ ID NO: 1 с обеих сторон. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с пептидом, состоящим из остатков 35-51 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления эпитоп состоит из 3-20 смежных остатков SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления любого из вариантов осуществления, раскрытых в настоящей заявке, антитело обладает одним или несколькими из следующих свойств: (a) ингибирует связывание TIGIT с CD155, необязательно с IC50 15-100 нг/мл, (b) повышает естественную Т-клеточную активацию в присутствии антигенпрезентирующих клеток, экспрессирующих CD155, как измерено по продукции IL-2, необязательно 1,5-3-кратно, (c) повышает антигенспецифическую Т-клеточную активацию, как измерено по продукции IL-12, необязательно 1,5-3-кратно, (d) повышает активацию природных киллерных клеток, как измерено по продукции любого из IL-2, IL-6, TNF α или IFN γ , необязательно 1,5-3-кратно, (e) повышает продукцию Т-клетками по меньшей мере одного провоспалительного цитокина, необязательно 1,5-3-кратно, и (f) уменьшает продукцию Т-клетками по меньшей мере одного противовоспалительного цитокина, необязательно 1,5-3-кратно.

В другом аспекте в настоящей заявке представлены фармацевтические композиции, включающие любое из антител, описанных в настоящей заявке, и фармацевтически приемлемый носитель.

В других аспектах в настоящей заявке представлены способы для лечения или осуществления профилактики злокачественного новообразования, включающие введение индивиду, имеющему рак или повышенный риск развития злокачественного новообразования эффективного режима или терапевтически эффективного количества любого из антител, раскрытых в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой острый миелоидный лейкоз или Т-клеточный лейкоз взрослых. В некоторых вариантах осуществления любого из вариантов осуществления, раскрытых в настоящей заявке, индивиду вводят опухоль-инфильтрирующие Т-клетки, которые активируются антителом. В некоторых вариантах осуществления любого из вариантов осуществления, раскрытых в настоящей заявке, индивиду вводят вакцину, индуцирующую иммунный ответ против злокачественного новообразования, который усиливается антителом. В некоторых вариантах осуществления вакцина включает антиген или его фрагмент, экспрессируемый на поверхности раковых клеток. В некоторых вариантах осуществления любого из вариантов осуществления, раскрытых в настоящей заявке, индивиду вводят природные киллерные клетки, цитотоксичность которых против злокачественного новообразования усиливается антителом. В некоторых вариантах осуществления любого из вариантов осуществления, раскрытых в настоящей заявке, индивиду также вводят второе антитело против антигена, экспрессированного на поверхности клеток злокачественного новообразования, при этом эффектор-опосредованная цитотоксичность второго антитела против злокачественного новообразования усиливается антителом. В некоторых вариантах осуществления любого из вариантов осуществления, раскрытых в настоящей заявке, индивиду также вводят второе антитело против антигена, экспрессированного на поверхности иммунной клетки. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой Т-клетку или природную киллерную клетку. В некоторых вариантах осуществления любого из вариантов осуществления, раскрытых в настоящей заявке, антиген представляет собой CTLA-4, PD-1 или PD-L1. В некоторых вариантах осуществления любого из вариантов осуществления, раскрытых в настоящей заявке, индивиду также вводят одно или несколько лечений, выбранных из группы, состоящей из химиотерапии, облучения, клеточной терапии и хирургической операции. В некоторых вариантах осуществления любого из вариантов осуществления, раскрытых в настоящей заявке, индивиду также вводят ингибитор одного или нескольких рецепторов или лигандов иммунных контрольных точек. В некоторых вариантах осуществления ингибитор выбран из группы, состоящей из ипилимумаба, ниволумаба, пембролизумаба (ламбролизумаб) и атезолизумаба.

В дополнительных аспектах в настоящей заявке представлены способы для лечения индивида, инфицированного патогеном, включающие введение индивиду эффективного режима или терапевтически эффективного количества любого из антител, раскрытых в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления патоген представляет собой вирусный, бактериальный, грибковый или простейший патоген. В некоторых вариантах осуществления патоген представляет собой ВИЧ, ВСГ, вирус гепатита, вирус герпеса, аденовирус, вирус гриппа, флавивирус, эховирус, риновирус, вирус Коксаки, коронавирус, респираторный синцитиальный вирус, вирус эпидемического паротита, ротавирус, вирус кори, вирус

краснухи, парвовирус, вирус коровьей оспы, HTLV вирус (Т лимфотропный вирус человека), вирус денге, папилломавирус, вирус моллюска, полиовирус, вирус бешенства, JC вирус, вирус арбовирусного энцефалита, хламидии, бактерии риккетсии, микобактерии, стафилококки, стрептококки, пневмококки, менингококки, гонококки, клебсиеллу, протеус, серрацию, псевдомонас, легионеллу, дифтерийную палочку, палочку сальмонеллы, бактерии, вызывающие холеру, столбняк, ботулизм, сибирскую язву, чуму, лептоспироз и болезнь Лайма. В некоторых вариантах осуществления любого из вариантов осуществления, раскрытых в настоящей заявке, индивиду лечат вакциной, индуцирующей иммунный ответ против патогена, который усиливается антителом. В некоторых вариантах осуществления вакцина включает белок патогена или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления любого из вариантов осуществления, раскрытых в настоящей заявке, индивиду также вводят второе антитело против патогена, где эффектор-опосредованная цитотоксичность второго антитела против патогена усиливается антителом. В некоторых вариантах осуществления любого из вариантов осуществления, раскрытых в настоящей заявке, индивиду также вводят одно или несколько из противовирусного средства, антипаразитарного средства, антибактериального средства или противогрибкового средства.

В другом аспекте в настоящей заявке представлены способы, способствующие лечению злокачественного новообразования, включающие введение индивиду, имеющему рак, терапевтически эффективного количества любого из антител, раскрытых в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой острый миелоидный лейкоз или Т-клеточный лейкоз взрослых. В некоторых вариантах осуществления любого из вариантов осуществления, раскрытых в настоящей заявке, индивиду вводят опухоль-инфильтрирующие Т-клетки, которые активируются антителом. В некоторых вариантах осуществления любого из вариантов осуществления, раскрытых в настоящей заявке, индивиду вводят вакцину, индуцирующую иммунный ответ против злокачественного новообразования, который усиливается антителом. В некоторых вариантах осуществления вакцина включает антиген, экспрессированный на поверхности раковых клеток, или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления любого из вариантов осуществления, раскрытых в настоящей заявке, индивиду вводят природные киллерные клетки, цитотоксичность которых против злокачественного новообразования усиливается антителом. В некоторых вариантах осуществления любого из вариантов осуществления, раскрытых в настоящей заявке, индивиду вводят второе антитело против антигена, экспрессированного на поверхности клеток злокачественного новообразования, при этом эффектор-опосредованная цитотоксичность второго антитела против злокачественного новообразования усиливается антителом. В некоторых вариантах осуществления любого из вариантов осуществления, раскрытых в настоящей заявке, индивиду также вводят второе антитело против антигена, экспрессированного на поверхности иммунной клетки. В некоторых вариантах осуществления иммунная клетка представляет собой Т-клетку или природную киллерную клетку. В некоторых вариантах осуществления любого из вариантов осуществления, раскрытых в настоящей заявке, антиген представляет собой CTLA-4, PD-1 или PD-L1. В некоторых вариантах осуществления любого из вариантов осуществления, раскрытых в настоящей заявке, индивиду также вводят одно или несколько лечений, выбранных из группы, состоящей из химиотерапии, облучения, клеточной терапии и хирургической операции. В некоторых вариантах осуществления любого из вариантов осуществления, раскрытых в настоящей заявке, индивиду также вводят ингибитор одного или нескольких рецепторов или лигандов иммунных контрольных точек. В некоторых вариантах осуществления один или несколько рецепторов или лигандов иммунных контрольных точек выбраны из группы, состоящей из CTLA-4, PD-1 и PD-L1. В некоторых вариантах осуществления ингибитор выбран из группы, состоящей из ипилимумаба, ниволумаба, пембролизумаба (ламбролизумаб) и атезолизумаба.

Каждый из аспектов и вариантов осуществления, описанных в настоящей заявке, можно использовать вместе, если только он явно или определенно не исключен из контекста варианта осуществления или аспекта.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 схематически представляет структуру векторов экспрессии для рекомбинантных TIGIT и CD155 белков.

Фиг. 2 представляет ингибирование взаимодействия TIGIT-CD155 анти-TIGIT антителами.

Фиг. 3 представляет аминокислотную последовательность TIG1 VH.

Фиг. 4 представляет аминокислотную последовательность TIG1 VL.

Фиг. 5 представляет аминокислотную последовательность TIG2 VH.

Фиг. 6 представляет аминокислотную последовательность TIG2 VL.

Фиг. 7 представляет аминокислотную последовательность TIG3 VH.

Фиг. 8 представляет аминокислотную последовательность TIG3 VL.

Фиг. 9А представляет нуклеотидную последовательность HuTIG1 VH гена и кодируемую аминокислотную последовательность, тогда как фиг. 9В представляет нуклеотидную последовательность HuTIG1 VL гена и кодируемую аминокислотную последовательность.

Фиг. 10 схематически представляет структуру вектора экспрессии pHuTIG1.AA.

Фиг. 11 показывает результаты ELISA анализа связывания HuTIG1-IgG1.AA с человеческим TIGIT.

Фиг. 12 - FACS анализ связывания HuTIG1-IgG1.AA и HuTIG3-IgG1.AA с человеческим TIGIT.

Фиг. 13 представляет график, показывающий блокирование взаимодействия между человеческим TIGIT и человеческим CD155 при помощи HuTIG1-IgG1.AA и HuTIG3-IgG1.AA.

Фиг. 14А представляет нуклеотидную последовательность HuTIG3 VH гена и кодируемую аминокислотную последовательность, тогда как фиг. 14В представляет нуклеотидную последовательность HuTIG3 VL гена и кодируемую аминокислотную последовательность.

Фиг. 15 представляет ELISA анализ связывания HuTIG3-IgG1.AA с человеческим TIGIT.

Фиг. 16 показывает повышенную продукцию IL-2, вызываемую TIG1, при стимуляции антигенспецифического иммунного ответа.

Фиг. 17 представляет повышенную CD4+ и CD8+ Т-клеточную пролиферацию, вызываемую TIG1, при стимуляции антигенспецифического иммунного ответа.

Фиг. 18 представляет экспрессию CD155 на K562 клетках (вверху) и TIGIT на NK клетках (внизу).

Фиг. 19 представляет повышенную NK-клеточно-опосредованную цитотоксичность, вызываемую TIG1 на K562 клетках-мишенях.

Фиг. 20 показывает, что HuTIG1-IgG1.AA потенцирует эффекторные ответы цитокинов.

Фиг. 21 представляет экспрессию человеческого TIGIT клеточной линией Jurkat-TIGIT на поверхности клеток.

Фиг. 22 показывает, что HuTIG1-IgG1.AA и HuTIG3-IgG1.AA не вызывают активность CDC.

Фиг. 23 показывает, что HuTIG1-IgG1.AA и HuTIG3-IgG1.AA повышали естественную Т-клеточную активацию в *in vitro* анализе Т-клеточной антагонистической активности для античеловеческого антитела к TIGIT.

Фиг. 24 представляет CD112, CD155 и PD-L1, экспрессированные GM-CSF/IL-4 дифференцированными дендритными клетками моноцитарного происхождения (moDCs).

Фиг. 25 представляет повышенную секрецию IFN γ при добавлении HuTIG1-IgG1.AA, анти-PD-L1 антитела и HuTIG1-IgG1.AA в комбинации с анти-PD-L1 антителом.

Фиг. 26А представляет экспрессию TIGIT и CD96 на человеческих лимфоидных и миелоидных клетках.

Фиг. 26В представляет репрезентативные гистограммы анти-TIGIT окрашивания при различных уровнях экспрессии.

Фиг. 27 представляет картирование эпитопов HuTIG1-IgG1.AA методом проточной цитометрии.

Фиг. 28 представляет ленточное представление внеклеточного IgV домена человеческого TIGIT с пронумерованными боковыми цепями аминокислотных остатков эпитопа в виде трехмерной фигуры.

Фиг. 29А и 29В показывают результаты анализа CD4+ Т-клеточной субпопуляции для определения экспрессии TIGIT.

Фиг. 30А и 30В показывают результаты анализа CD8+ Т-клеточной субпопуляции для определения экспрессии TIGIT.

Фиг. 31 представляет повышенную NK клеточно-опосредованную цитотоксичность, вызываемую HuTIG1-IgG1.AA и HuTIG3-IgG1.AA, на K562 клетках-мишенях.

Фиг. 32А представляет экспрессию TIGIT на опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах из диссоциированных образцов опухолей.

Фиг. 32В представляет репрезентативные гистограммы анти-TIGIT окрашивания при различных уровнях экспрессии.

Подробное описание

Изобретение обеспечивает, *inter alia*, моноклональные антитела, которые специфически связываются с внеклеточным доменом TIGIT, который является членом суперсемейства иммуноглобулинов с иммунорецепторным тирозиновым ингибиторным мотивом (ITIM) в цитоплазматическом концевом сегменте. Моноклональные антитела ингибируют связывание TIGIT с CD155 и, таким образом, могут активировать Т-клетки и/или NK клетки. Моноклональные антитела можно использовать для лечения злокачественного новообразования и инфекционного заболевания, среди прочих применений.

I. Определения

Моноклональные антитела или другие биологические соединения, такие как фрагмент TIGIT, типично обеспечиваются в выделенной форме. Это значит, что антитело или другое биологическое соединение типично является по меньшей мере на 50% мас./мас. очищенным от мешающих белков и других примесей, возникающих при его получении или очистке, но не исключена возможность того, что моноклональное антитело объединено с избыточным количеством фармацевтически приемлемого носителя(носителей) или другого наполнителя, предназначенного для облегчения его использования. Иногда моноклональные антитела по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 95 или 99% мас./мас. очищены от мешающих белков и примесей от процесса получения или очистки. Часто выделенное моноклональное антитело или другое биологическое соединение является преобладающей макромолекулярной частицей, оставшейся после очистки.

Специфическое связывание моноклонального антитела с его целевым антигеном означает аффинность (константу ассоциации или K_a) по меньшей мере 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 или 10^{10} M^{-1} , определенную, например, в анализе примера 15. Специфическое связывание заметно выше по величине и отлично от не-

специфического связывания, происходящего с по меньшей мере одной неродственной мишенью. Специфическое связывание может быть результатом образования связей между конкретными функциональными группами или конкретной пространственной соответствующей структурой (например, по типу замка и ключа), тогда как неспецифическое связывание обычно является результатом ван-дер-ваальсовых сил. Специфическое связывание, однако, необязательно предполагает, что моноклональное антитело связывается с одной и только с одной мишенью.

Основной структурной единицей антитела является тетрамер субъединиц. Каждый тетрамер включает две идентичные пары полипептидных цепей, при этом каждая пара имеет одну "легкую" (около 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (около 50-70 кДа). Аминоконцевая часть каждой цепи включает вариабельную область из около 100-110 или больше аминокислот, преимущественно ответственную за распознавание антигена. Эта вариабельная область изначально экспрессируется связанной с отщепляемым сигнальным пептидом. Вариабельную область без сигнального пептида иногда называют зрелой вариабельной областью. Таким образом, например, зрелая вариабельная область легкой цепи означает вариабельную область легкой цепи без сигнального пептида легкой цепи. Карбоксиконцевая часть каждой цепи определяет константную область, преимущественно ответственную за эффекторную функцию.

Легкие цепи классифицируются как каппа- или лямбда-цепи. Тяжелые цепи классифицируются как гамма-, мю-, альфа-, дельта- или эpsilon-цепи и определяют изотип антитела, такой как IgG, IgM, IgA, IgD и IgE соответственно. В пределах легких и тяжелых цепей вариабельные и константные области связаны "J"-областью, состоящей из около 12 или более аминокислот, при этом тяжелая цепь также включает "D"-область, состоящую из около 10 или более аминокислот. (См., общее описание в *Fundamental Immunology* (Paul W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y., 1989, Ch. 7, полное содержание которого включено посредством ссылки во всей полноте для всех целей).

Зрелые вариабельные области каждой пары легкой/тяжелой цепи образуют связывающий сайт антитела. Таким образом, интактное антитело имеет два связывающих сайта. За исключением бифункциональных или биспецифических антител, эти два сайта связывания являются одинаковыми. Все цепи демонстрируют одинаковую общую структуру из относительно консервативных каркасных областей (FR), соединенных тремя гипервариабельными областями, также называемыми определяющими комплементарность областями, или CDR. CDR из двух цепей каждой пары соединяются посредством каркасных областей, обеспечивая связывание со специфическим эпитопом. От N-конца до C-конца легкая и тяжелая цепи включают домены FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Присвоение аминокислот каждому домену осуществляется в соответствии с определением по Кэботу, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 and 1991) или Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Chothia et al., *Nature* 342:878-883 (1989). Кроме того, Кэбат обеспечивает широко используемую систему нумерации (нумерация по Кэботу), в которой соответствующим остаткам между различными тяжелыми цепями или между различными легкими цепями присвоены одинаковые номера.

Термин "антитело" включает интактные антитела и их связывающие фрагменты. Таким образом, любую ссылку на антитело следует понимать как ссылку на антитело в интактной форме или связывающийся фрагмент, если только из контекста не следует иное. Как правило, фрагменты конкурируют с интактным антителом, из которого они происходят, за специфическое связывание с мишенью, включая отдельные тяжелые цепи, легкие цепи Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab)₂, Dabs, нанотела и scFv, диатела, scFv-Fc, мини-тела, IgNARs, V-NAR, hcIgG, bis-scFv, триатела и тетратела. Фрагменты могут быть получены методами рекомбинантных ДНК или путем ферментативного или химического расщепления интактных иммуноглобулинов. Термин "антитело" также относится к биспецифическому антителу. Биспецифическое или бифункциональное антитело представляет собой искусственное гибридное антитело, обладающее двумя различными парами тяжелой/легкой цепи и двумя разными сайтами связывания (см., например, Songsivilai and Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.*, 79:315-321 (1990); Kostelny et al., *J. Immunol.* 148: 1547-53 (1992)).

Термин "эпитоп" относится к участку антигена, с которым связывается антитело. Эпитоп может быть сформирован из смежных или несмежных аминокислот, которые накладываются друг на друга при укладке в третичную структуру одного или нескольких белков. Эпитопы, образованные из смежных аминокислот (также известные как линейные эпитопы), обычно сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, в то время как эпитопы, образованные при формировании третичной структуры (также известные как конформационные эпитопы), обычно теряются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп типично включает по меньшей мере 3 или более, обычно по меньшей мере 5 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Методы определения пространственной конформации эпитопов включают, например, рентгеновскую кристаллографию и двумерный ядерный магнитный резонанс. См., например, *Протоколы картирования эпитопов в Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996).

Антитела, которые распознают одинаковые или перекрывающиеся эпитопы, могут быть идентифицированы с помощью обычного иммунного анализа, выявляющего способность одного антитела конкурировать за связывание с антигеном-мишенью с другим антителом. Эпитоп антитела может быть также определен при помощи рентгеновской кристаллографии антитела, связанного с его антигеном, для иден-

тификации контактных остатков. Альтернативно, два антитела имеют один и тот же эпитоп, если все аминокислотные мутации в антигене, которые уменьшают или элиминируют связывание одного антитела, уменьшают или элиминируют связывание другого антитела. Два антитела имеют перекрывающиеся эпитопы, если некоторые аминокислотные мутации, которые уменьшают или элиминируют связывание одного антитела, уменьшают или элиминируют связывание другого антитела.

Конкуренцию между антителами определяют при помощи анализа, в котором антитело в условиях испытания ингибирует специфическое связывание контрольного антитела с общим антигеном (см., например, Junghans et al., *Cancer Res.* 50: 1495, 1990). Испытываемое антитело конкурирует с контрольным антителом, если избыток испытываемого антитела (например, по меньшей мере 2х, 3х, 4х, 5х, 6х, 7х, 8х, 9х, 10х, 15х, 20х, 25х, 30х, 35х, 40х, 45х, 50х, 60х, 70х, 80х, 90х, 100х или больше, включая значения между указанными значениями) ингибирует связывание контрольного антитела по меньшей мере на 50%, но предпочтительно на 75%, 90% или 99%. В других вариантах осуществления испытываемое антитело конкурирует с контрольным антителом, если избыток испытываемого антитела ингибирует связывание контрольного антитела на любую величину из по меньшей мере около 55, 60, 65, 70% или предпочтительно по меньшей мере около 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81%, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%, как измерено в анализе конкурентного связывания. Антитела, идентифицированные с помощью методов конкурентного связывания (конкурирующие антитела), включают антитела, связывающиеся с тем же эпитопом, что и контрольное антитело, и антитела, связывающиеся со смежным эпитопом, расположенным проксимально по отношению к эпитопу, с которым связывается контрольное антитело, для образования пространственного затруднения. Предпочтительно конкуренцию оценивают, как описано в примере 14.

Термин "индивид" включает человека и других индивидов-млекопитающих. В некоторых случаях способы по изобретению можно использовать для экспериментальных животных, в ветеринарии и в разработке животных моделей для заболевания, включая, но не ограничиваясь этим, грызунов, включая мышей, крыс, хомяков, а также приматов, таких как обезьяны. В некоторых вариантах осуществления индивиды принимают, или являются кандидатами для приема, либо профилактическое, либо терапевтическое лечение.

В контексте настоящей заявки аминокислотный остаток из представляющей интерес аминокислотной последовательности, который "соответствует" или является "соответствующим" или в "соответствии с" аминокислотным остатком эталонной аминокислотной последовательности, показывает, что аминокислотный остаток из представляющей интерес последовательности находится в положении, гомологичном или эквивалентном указанному остатку в эталонной аминокислотной последовательности. Специалист в данной области сможет определить, соответствует ли положение конкретного аминокислотного остатка в полипептиде, таком как полипептид TIGIT, положению такого остатка в гомологичной эталонной последовательности. Например, последовательность полипептида TIGIT может быть выровнена с эталонной последовательностью с использованием известных методов (например, средства поиска основного локального выравнивания (BLAST), ClustalW2, программы выравнивания последовательностей на основе структуры (STRAP) и т.п.). Кроме того, координаты кристаллической структуры эталонной последовательности могут быть использованы в качестве помощи при определении трехмерной структуры гомологичного полипептидного остатка (Stengel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 109: 5399-5404, 2012). В другом аспекте эквивалентные остатки могут быть идентифицированы путем определения гомологии на уровне третичной структуры. Используя такие способы, аминокислотные остатки полипептидного варианта TIGIT могут быть пронумерованы в соответствии с нумерацией положений аминокислотных остатков эталонной последовательности. Например, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 можно использовать для определения нумерации положений аминокислотных остатков для каждого аминокислотного остатка TIGIT варианта, представляющего интерес, или эпитопа. В некоторых вариантах осуществления одна аминокислотная последовательность соответствует другой аминокислотной последовательности, если они имеют идентичность последовательностей по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%.

Для целей классификации аминокислотных замен как консервативных или неконсервативных, аминокислоты сгруппированы следующим образом: Группа I (гидрофобные боковые цепи): Met, Ala, Val, Leu, Ile; Группа II (нейтральные гидрофильные боковые цепи): Cys, Ser, Thr; Группа III (кислотные боковые цепи): Asp, Glu; Группа IV (основные боковые цепи): Asn, Gln, His, Lys, Arg; Группа V (остатки, влияющие на ориентацию цепей): Gly, Pro; и Группа VI (ароматические боковые цепи): Trp, Tyr, Phe. Консервативные замены включают замены между аминокислотами того же класса. Неконсервативные замены включают обмен члена одного из этих классов на член другого класса.

Процент идентичности последовательностей определяют путем максимального выравнивания последовательностей антител с использованием системы нумерации Кэбота. После выравнивания, если представляющую интерес область антитела (например, весь зрелый вариабельный участок тяжелой или легкой цепи) сравнивают с такой же областью эталонного антитела, то процент идентичности последовательностей между областями сравниваемого и эталонного антитела представляет собой количество положений, занятых той же аминокислотой как в области сравниваемого, так и эталонного антитела, де-

ленное на общее количество выровненных положений двух областей, причем пропуски не учитываются, умноженное на 100 для преобразования в проценты.

Композиции или способы "включающие" один или несколько перечисляемых элементов, могут включать другие элементы, конкретно не указанные. Например, композиция, которая включает антитело, может содержать только антитело или антитело в комбинации с другими ингредиентами.

Если явно не следует из контекста, ссылка на диапазон включает все целые числа в рамках этого диапазона и все поддиапазоны, определяемые такими целыми числами.

II. Молекулы-мишени

Если не указано иное, TIGIT означает человеческий TIGIT. Иллюстративной человеческой последовательности присвоен Swiss-Prot номер доступа Q495A1. Полная последовательность человеческого TIGIT содержит 244 аминокислот, из которых аминокислоты 1-21 представляют собой сигнальный пептид, а аминокислоты 22-244 образуют зрелый белок (SEQ ID NO: 1). Приблизительно остатки 22-141 образуют внеклеточный домен (SEQ ID NO: 3). Приблизительно остатки 142-162 образуют трансмембранный домен, и приблизительно остатки 163-244 образуют цитоплазматический домен.

Если не указано иное, CD155 относится к человеческой форме этого белка. Иллюстративная человеческая последовательность для человеческого CD155 обозначена как Swiss-Prot P15151, которая представляет собой белок из 417 аминокислот, из которых приблизительно остатки 1-20 представляют собой сигнальный пептид, 21-343 представляют собой внеклеточный домен (SEQ ID NO: 6), 344-367 представляют собой трансмембранный домен и 368-417 представляют собой цитоплазматический домен.

Если явно не следует из контекста, ссылка на один из указанных выше белков означает по меньшей мере внеклеточный домен белка, и обычно полный белок за исключением отщепляемого сигнального пептида.

III. Антитела по изобретению

A. Специфичность связывания и функциональные свойства

Изобретение обеспечивает моноклональные антитела, связывающиеся с эпитопами во внеклеточном домене TIGIT белка. Антитела, обозначенные как TIG1, TIG2 и TIG3, являются тремя такими иллюстративными мышинными антителами. Последовательности зрелых переменных областей тяжелых и легких цепей этих антител обозначены как SEQ ID NO: 10 и 14, 18 и 22, и 26 и 30 соответственно. TIG1, TIG2 и TIG3 специфически связываются с внеклеточным доменом человеческого TIGIT.

Некоторые антитела по изобретению связываются с тем же или перекрывающемся эпитопом, что и антитело, обозначенное как TIG1, TIG2 или TIG3. Другие антитела, обладающие такой специфичностью связывания, можно получить иммунизацией мышей при помощи TIGIT или его части, включая целевой эпитоп, и скрининга полученных антител на связывание с внеклеточным доменом TIGIT, необязательно в конкуренции с TIG1, TIG2 или TIG3. Антитела также можно скринировать против мутагенезированных форм TIGIT антигена для идентификации антитела, показывающего такой же или подобный профиль связывания с коллекцией мутационных изменений, как TIG1, TIG2 или TIG3. Мутации могут представлять собой системную замену аланином (или серином, если аланин уже присутствует) одного остатка за раз, или с более широкими промежутками, по всему внеклеточному домену TIGIT антитела или его части, в которой, как известно, находится эпитоп.

В примере 16 картированы остатки 35, 37, 49 и 51 SEQ ID NO: 1 как представляющие собой остатки, образующие эпитоп TIG1 антитела. Замена аланином на любом из этих остатков по существу устраняет связывание антитела. Изобретение, таким образом, включает другие антитела, связывающиеся с эпитопом человеческого TIGIT, включающим остатки 35 и 37 SEQ NO: 1 и/или остатки 49 и 51 SEQ ID NO: 1, и предпочтительно эпитопом, включающим все из этих остатков. Эпитоп может быть линейным (например, 3-20, 3-17 или 5-10 смежных остатков) или конформационным. Некоторые такие антитела связываются с пептидом, состоящим из остатков 35-51 SEQ ID NO: 1 и не более чем 1, 2, 3, 4 или 5 фланкирующих аминокислот из SEQ ID NO: 1 с обеих сторон. Некоторые такие антитела связываются с пептидом, состоящим из остатков 35-51 SEQ ID NO: 1. Некоторые такие антитела могут быть генерированы путем иммунизации такими пептидами. Пример 19 также показывает, что остаток 90 SEQ ID NO: 1 является критическим для связывания гуманизированного (Hu)TIG1 антитела с TIGIT, в дополнение к остаткам 35, 37, 49 и 51 SEQ ID NO: 1. В других вариантах осуществления антитело (такое как HuTIG1 антитело) связывается с эпитопом, включающим один или несколько из остатков, соответствующих аминокислотным положениям 35, 37, 49, 51 и/или 90 SEQ ID NO: 1. В других вариантах осуществления антитело (такое как HuTIG1 антитело) не связывается с одним или несколькими остатками, соответствующими аминокислотным положениям 34, 39, 44, 47, 52, 55, 86, 88, 92 и/или 96 SEQ ID NO: 1.

Антитела, обладающие специфичностью связывания выбранного мышинового антитела (например, TIG1, TIG2 или TIG3), также можно получить с использованием варианта метода фагового дисплея. См. Winter, WO 92/20791. Этот метод является особенно подходящим для получения человеческих антител. В этом методе переменную область либо тяжелой, либо легкой цепи выбранного мышинового антитела используют в качестве исходного материала. Если, например, переменная область легкой цепи выбрана в качестве исходного материала, конструируют библиотеку фагов, в которой члены демонстрируют одинаковую переменную область легкой цепи (т.е. мышинового исходного материала) и разные переменные

ные области тяжелой цепи. Вариабельные области тяжелой цепи, например, можно получить из библиотеки перегруппированных человеческих вариабельных областей тяжелой цепи. Выбирают фаг, показывающий сильное специфическое связывание для TIGIT (например, по меньшей мере 10^8 , и предпочтительно по меньшей мере 10^9 M⁻¹). Вариабельная область тяжелой цепи из этого фага затем служит в качестве исходного материала для конструирования дополнительной библиотеки фагов. В этой библиотеке каждый из фагов демонстрирует одинаковую вариабельную область тяжелой цепи (т.е. область, идентифицированную из первой библиотеки фагового дисплея) и разные вариабельные области легкой цепи. Вариабельные области легкой цепи можно получить, например, из библиотеки перегруппированных человеческих вариабельных областей легкой цепи. Снова выбирают фаг, показывающий сильное специфическое связывание для TIGIT. Полученные антитела обычно имеют такую же или подобную специфичность в отношении эпитопа, как у исходного материала из мыши.

Некоторые антитела имеют зрелую вариабельную область тяжелой цепи, включающую CDR H1, H2 и H3, и зрелую область легкой цепи, включающую CDR L1, L2 и L3, полностью или по существу из TIG1. Некоторые антитела имеют зрелую вариабельную область тяжелой цепи, включающую CDR H1, H2 и H3, и зрелую вариабельную область легкой цепи, включающую CDR L1, L2 и L3, полностью или по существу из TIG2. Некоторые антитела имеют зрелую вариабельную область тяжелой цепи, включающую CDR H1, H2 и H3, и зрелую вариабельную область легкой цепи, включающую CDR L1, L2 и L3, полностью или по существу из TIG3. CDR могут быть определены в соответствии с любым принятым определением, включая определение по Кэботу, по Чотиа, по Кэботу и Чотиа, по AbM или определение по контакту, как показано в таблице ниже:

петля	Кэбот	AbM	Чотиа	Контакт
L1	L24--L34	L24--34	L24--L34	L30--L36
L2	L50--L56	L50--156	L50--L56	L46--L55
L3	L89--L97	L89--97	L89--L97	L89--L96
H1	H31--H35B (Нумерация по Кэботу)	H26--H35b	H26--H32..34	H30--H35B
H1	H31--H35 (Нумерация по Чотиа)	H26--H35	H26--H32	H30--H35
H2	H50--H65	H50--H58	H52--H56	H47--H58
H3	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H93--H10

Другие антитела можно получить путем мутагенеза кДНК, кодирующей тяжелую и легкую цепи иллюстративного антитела, такого как TIG1, TIG2 или TIG3. Моноклональные антитела, которые по меньшей мере на около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичны TIG1, TIG2 или TIG3 в аминокислотной последовательности зрелых вариабельных областей тяжелой и/или легкой цепи и сохраняют их функциональные свойства, и/или которые отличаются от соответствующего антитела небольшим количеством функционально несущественных аминокислотных замен (например, консервативных замен), делеций или инсерций, также включены в изобретение. Аминокислоты в каркасах вариабельных областей, возможно являющиеся важными для связывания, можно идентифицировать, как описано в разделах, относящихся к гуманизации, ниже. Моноклональные антитела, содержащие по меньшей мере одну и предпочтительно все шесть CDR(s), определенных по номенклатуре Кэбота, которые на любое из следующих значений около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичны соответствующим CDR TIG1, TIG2 или TIG3, также включены.

Антитела предпочтительно имеют одну или несколько из следующих характеристик (i) ингибирование связывания человеческого TIGIT с человеческим CD155, (ii) ингибирование связывания TIGIT с другими лигандами, такими как CD112 и CD113, (iii) усиление антигенспецифических Т-клеточных ответов, (iv) активация природных киллерных клеток, (v) стимуляция естественных Т-клеточных активаций, и (vi) стимуляция продукции одного или нескольких иммуностимуляторных цитокинов и/или снижение продукции одного или нескольких иммуносупрессорных цитокинов Т-клетками и другими клетками иммунной системы. Иллюстративные анализы для измерения этих свойств представлены в примерах.

Предпочтительные антитела полностью или частично ингибируют связывание TIGIT с CD155. Некоторые антитела могут ингибировать такое взаимодействие с любым из следующих значений IC₅₀ около 25-300 нг/мл, 25-75 нг/мл, 25-50 нг/мл, 40-75 нг/мл, 50-75 нг/мл, 50-90 нг/мл, 50-100 нг/мл, 75-100 нг/мл, 50-150, 75-175 нг/мл, 100-200 нг/мл, 125-225 нг/мл, 100-250 нг/мл, 150-300 нг/мл, 175-250 нг/мл, 200-300 нг/мл, 25-275 нг/мл, 250-300 нг/мл, 49 +/-10% нг/мл, 65 +/-10% нг/мл или 76 +/-10% нг/мл, измеренных, как описано в примерах. В других вариантах осуществления, антитела могут полностью или частично ингибировать связывание TIGIT с CD155 с любым из следующих значений IC₅₀ около 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275 или 300 нг/мл или больше, включая концентрации, находящиеся между этими значениями. Некоторые антитела могут усиливать антигенспецифические Т-клеточные отве-

ты 1,5-3-кратно, например, с любым из следующих значений усиления ответа примерно 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 или 3-кратно или больше, как измерено в примерах. Некоторые антитела могут повышать продукцию 1, 2, 3 или всех из IL-2, IL-6, TNF α и IFN γ NK-клетками 1,5-3-кратно, например, с любым из следующих значений повышения продукции примерно 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 или 3-кратно или больше, как измерено в примерах. Некоторые антитела могут повышать естественную Т-клеточную активацию 1,5-3-кратно, например, с любым из следующих значений повышения активации примерно 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 или 3-кратно или больше, как измерено в примерах. Некоторые антитела могут ингибировать рак или инфекционное заболевание, как показано в животной модели или клинических испытаниях. Животные модели злокачественного новообразования, в которых раковые клетки человека инъецируют иммунодефицитному лабораторному животному, такому как мышь или крыса, являются широко доступными.

Гуманизация или химеризация антител повышает период полужизни *in vivo* по сравнению с исходными мышинными антителами. Получаемый в результате период полужизни может составлять 10-50 дней, например, у человека. Период полужизни можно измерить путем фармакокинетических исследований, таких, которые описаны Kim et al, Eur J of Immunol 24:542 (1994).

В. Нечеловеческие антитела

Получение других нечеловеческих моноклональных антител, например, мышинных, морских свинок, приматов, кроличьих, куриных или крысиных, против TIGIT можно осуществить, например, путем иммунизации животного при помощи TIGIT или его фрагмента или клеток, несущих TIGIT. См. Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (CSHP NY, 1988) (включенный посредством ссылки для всех целей). Такой иммуноген можно получить из природного источника, путем пептидного синтеза или рекомбинантной экспрессии. Необязательно, иммуноген можно вводить слитым или иным образом, образующим комплекс с белком-носителем. Необязательно иммуноген можно вводить с адьювантом. Можно использовать несколько типов адьювантов, как описано ниже. Для иммунизации лабораторных животных предпочтительным является полный адьювант Фрейнда, затем неполный адьювант. Кроликов или морских свинок обычно используют для получения поликлональных антител. Мышей обычно используют для получения моноклональных антител. Антитела скринируют на специфическое связывание с TIGIT. Необязательно, антитела дополнительно скринируют на связывание с определенной областью TIGIT. Такой скрининг можно осуществить путем определения связывания антитела с коллекцией делеционных мутантов TIGIT и определения того, какие делеционные мутанты связываются с антителом. Связывание можно оценить, например, методом вестерн-блоттинга, FACS или ELISA.

С. Гуманизированные антитела

Уменьшение или устранение ответа НАМА (человеческого антимышинного (также применимо к человеческому антикрысиному или человеческому антикроличьему или человеческому антихомячьему и т.д.) антителу) является важным аспектом клинической разработки подходящих терапевтических средств. См., например, Khaxzaeli et al., J. Natl. Cancer Inst. (1988), 80:937; Jaffers et al., Transplantation (1986), 41:572; Shawler et al., J. Immunol. (1985), 135:1530; Sears et al., J. Biol. Response Mod. (1984), 3:138; Miller et al., Blood (1983), 62:988; Hakimi et al., J. Immunol. (1991), 147:1352; Reichmann et al., Nature (1988), 332:323; Junghans et al., Cancer Res. (1990), 50:1495. Как описано в настоящей заявке, изобретение обеспечивает антитела, которые являются гуманизированными, чтобы ответ НАМА уменьшался или устранялся. Варианты этих антител можно затем получить с использованием рутинных способов, известных из уровня техники, некоторые из которых описаны ниже.

Гуманизированное антитело представляет собой генетически сконструированное антитело, в котором CDR из нечеловеческого "донорного" антитела пересажены в последовательности человеческого "акцепторного" антитела (см., например, Queen, US 5530101 и 5585089; Winter, US 5225539, Carter, US 6407213, Adair, US 5859205, 6881557, Foote, US 6881557). Последовательности акцепторного антитела могут представлять собой, например, зрелую последовательность человеческого антитела, смесь таких последовательностей, консенсусную последовательность из последовательностей человеческого антитела или последовательность области зародышевой линии. Таким образом, гуманизированное антитело представляет собой антитело, содержащее некоторые или все CDR полностью или по существу из донорного антитела и каркасные последовательности переменных областей и константные области, если присутствуют, полностью или по существу из последовательностей человеческого антитела. Подобным образом гуманизированная тяжелая цепь содержит по меньшей мере одну, две и обычно все три CDR полностью или по существу из тяжелой цепи донорного антитела, и каркасную последовательность переменной области тяжелой цепи и константную область тяжелой цепи, если присутствуют, по существу из человеческих последовательностей каркасного участка переменной области тяжелой цепи и константной области. Подобным образом, гуманизированная легкая цепь содержит по меньшей мере одну, две и обычно все три CDR полностью или по существу из легкой цепи донорного антитела и каркасную последовательность переменной области легкой цепи и константную область легкой цепи, если присутствуют, по существу из человеческих последовательностей каркасного участка переменной области легкой цепи и константной области. В отличие от нанотел и dAbs гуманизированное антитело включает

гуманизованную тяжелую цепь и гуманизованную легкую цепь. Здесь и далее в настоящей заявке CDR в рассматриваемом антителе по существу из соответствующей CDR в эталонном антителе, когда по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% соответствующих остатков (определенных по Кэботу) идентичны между соответствующими CDR; однако, CDR H2, как определено по номенклатуре Кэбота, в рассматриваемом антителе происходит по существу из соответствующей CDR в эталонном антителе, когда по меньшей мере около 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% соответствующих остатков (определенных по Кэботу) идентичны между соответствующими CDR. Каркасные последовательности варибельной области цепи антитела или константная область цепи антитела происходят по существу из человеческой каркасной последовательности варибельной области или человеческой константной области, соответственно, когда по меньшей мере около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% соответствующих остатков, определенных по Кэботу, являются идентичными.

Хотя гуманизованные антитела часто включают все шесть CDR (предпочтительно, определенных по номенклатуре Кэбота) из нечеловеческого (например, мышшиного) антитела, они также могут быть получены с меньшим числом CDR (например, по меньшей мере 3, 4 или 5) CDR из нечеловеческого антитела (например, Pascalis et al., *J. Immunol.* 169:3076, 2002; Vajdos et al., *Journal of Molecular Biology*, 320: 415-428, 2002; Iwahashi et al., *Mol. Immunol.* 36:1079-1091, 1999; Tamura et al, *Journal of Immunology*, 164:1432-1441, 2000).

В некоторых антителах только часть CDR, а именно ряд CDR остатков, необходимых для связывания, называемых SDR, требуются для сохранения связывания в гуманизованном антителе. CDR остатки, не контактирующие с антигеном и не находящиеся в SDR, могут быть идентифицированы на основании предыдущего исследования (например, остатки H60-H65 в CDR H2 часто не требуются) из областей CDR по системе Кэбота, расположенных вне гиперварибельных петель Чотиа (Chothia, *J. Mol. Biol.* 196:901, 1987), методом молекулярного моделирования и/или эмпирически или как описано в Gonzales et al., *Mol. Immunol.* 41: 863, 2004. В таких гуманизованных антителах в положениях, в которых один или несколько из донорных CDR остатков отсутствует или в которых отсутствует вся донорная CDR, аминокислота, занимающая такое положение, может представлять собой аминокислоту, занимающую соответствующее положение (в соответствии с нумерацией Кэбота) в последовательности акцепторного антитела. Количество таких замен для включения акцепторных аминокислот вместо донорных в CDR отражает баланс соображений, касающихся конкуренции. Такие замены потенциально выгодны для уменьшения количества мышшиных аминокислот в гуманизованном антителе и, как следствие, уменьшения потенциальной иммуногенности. Однако замены также могут вызывать изменения аффинности, и предпочтительно избегать значительного снижения аффинности. Положения для замещения внутри CDR и аминокислоты для замены также могут быть выбраны эмпирически.

Хотя акцептор может быть идентичным по последовательности выбранной человеческой каркасной последовательности независимо от того, происходит ли она из человеческого иммуноглобулина или человеческой консенсусной каркасной последовательности, настоящее изобретение предполагает, что акцепторная последовательность может включать ранее существовавшие аминокислотные замены относительно последовательности человеческого иммуноглобулина или человеческой консенсусной каркасной последовательности. Эти ранее существовавшие замены предпочтительно минимальны; обычно разница только в четырех, трех, двух или одной аминокислоте по отношению к человеческой последовательности иммуноглобулина или консенсусной каркасной последовательности.

Последовательности человеческого акцепторного антитела необязательно могут быть выбраны из множества известных последовательностей человеческих антител для обеспечения высокой степени идентичности последовательностей (например, 65-85% идентичности) между каркасами варибельной области человеческой акцепторной последовательности и соответствующими каркасами варибельной области цепи донорного антитела.

Некоторые аминокислоты из каркасных остатков человеческой варибельной области могут быть выбраны для замены на основании их возможного влияния на CDR конформацию и/или связывание с антигеном. Для исследования таких возможных влияний используют моделирование, исследование характеристик аминокислот в конкретных положениях или эмпирическое наблюдение эффектов замен или мутагенеза конкретных аминокислот.

Например, в случае отличий аминокислоты между каркасным остатком нечеловеческой варибельной области и выбранным каркасным остатком человеческой варибельной области, человеческая аминокислота каркасного участка может быть заменена эквивалентной аминокислотой каркасного участка из нечеловеческого антитела, когда есть основания ожидать, что аминокислота:

- (1) нековалентно связывается с антигеном непосредственно,
- (2) является смежной с CDR областью,
- (3) как-либо иначе взаимодействует с CDR областью (например, находится в пределах около 6 Å от CDR области).

Другими кандидатами для замены являются аминокислоты акцепторной человеческой каркасной

области, которые являются необычными для иммуноглобулина человека в этом положении. Эти аминокислоты могут быть заменены аминокислотами из эквивалентного положения нечеловеческого донорного антитела или из эквивалентных положений более типичных человеческих иммуноглобулинов. Другими кандидатами для замены являются аминокислоты акцепторной человеческой каркасной области, которые являются необычными для иммуноглобулина человека в этом положении.

Предпочтительное гуманизованное антитело содержит зрелую переменную область тяжелой цепи по меньшей мере на около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или меньше чем 100% идентичную SEQ ID NO: 35 и зрелую переменную область легкой цепи по меньшей мере на около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или меньше чем 100% идентичную SEQ ID NO: 37. Предпочтительно любое изменение может иметь место по каркасным остаткам переменной области за исключением тех, которые определены как возможно важные для связывания (см. абзац [0073]). Предпочтительно любое изменение представляет собой консервативную аминокислотную замену. Предпочтительное антитело включает зрелую переменную область тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 35 и зрелую переменную область легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 37. Для экспрессии полноразмерного антитела зрелую переменную область тяжелой цепи предпочтительно связывают с константной областью тяжелой цепи, состоящей из, или включающей, SEQ ID NO: 40, при условии, что С-концевой лизин может присутствовать или не присутствовать, и зрелую переменную область легкой цепи предпочтительно связывают с константной областью легкой цепи, состоящей из или, включающей, SEQ ID NO: 41.

Другое предпочтительное гуманизованное антитело содержит зрелую переменную область тяжелой цепи по меньшей мере на около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или меньше чем 100% идентичную SEQ ID NO: 43 и зрелую переменную область легкой цепи по меньшей мере на около 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или меньше чем 100% идентичную SEQ ID NO: 45. Предпочтительно, любое изменение имеет место по каркасным остаткам переменной области, за исключением тех, которые определены как возможно важные для связывания (см. абзац [0073] и примеры). Предпочтительно, любое изменение представляет собой консервативную аминокислотную замену. Предпочтительное антитело включает зрелую переменную область тяжелой цепи, имеющую последовательность SEQ ID NO: 43, и зрелую переменную область легкой цепи, имеющую последовательность SEQ ID NO: 45. Для экспрессии полноразмерного антитела зрелую переменную область тяжелой цепи предпочтительно связывают с константной областью тяжелой цепи, состоящей из, или включающей SEQ ID NO: 48, при условии, что С-концевой лизин может присутствовать или не присутствовать, и зрелую переменную область легкой цепи предпочтительно связывают с константной областью легкой цепи, состоящей из, или включающей, SEQ ID NO: 49.

D. Химерные и венерованные антитела

Изобретение также обеспечивает химерные и венерованные формы нечеловеческих антител, в частности, TIG1, TIG2, и TIG3 антител примеров.

Химерное антитело представляет собой антитело, в котором зрелые переменные области легкой и тяжелой цепей нечеловеческого антитела (например, мышинового) присутствуют в комбинации с человеческими константными областями легкой и тяжелой цепей. Такие антитела по существу или полностью сохраняют специфичность связывания нечеловеческого антитела и являются примерно на две трети человеческой последовательностью.

Венерованное антитело представляет собой тип гуманизованного антитела, которое сохраняет некоторые и обычно все из CDR и некоторые из каркасных остатков нечеловеческой переменной области нечеловеческого антитела, но с заменой других каркасных остатков переменной области, которые могут способствовать взаимодействию с В- или Т-клеточными эпитопами, например, экспонированных остатков (Padlan, Mol. Immunol. 28:489, 1991) остатками из соответствующих положений последовательности человеческого антитела. Результатом является антитело, в котором CDR полностью или по существу из нечеловеческого антитела, а каркасы переменных областей нечеловеческого антитела стали более подобны человеческим путем замен. Венерованные формы TIG1, TIG2 или TIG3 антитела включены в изобретение.

E. Человеческие антитела

Человеческие антитела против TIGIT обеспечиваются с использованием различных способов, описанных ниже. Некоторые человеческие антитела выбирают путем осуществления экспериментов конкурентного связывания, методом фагового дисплея Winter, описанного выше, либо как имеющие такую же эпитоп-специфичность, как у конкретного мышинового антитела, такого как одно из мышинных моноклональных антител, описанных в примерах. Человеческие антитела также можно скринировать на специфичность в отношении конкретного эпитопа с использованием только фрагмента TIGIT в качестве антигена-мишени и/или путем скрининга антитела против коллекции делеционных мутантов TIGIT.

Способы получения человеческих антител включают триомный метод Oestberg et al., Hybridoma 2:361-367 (1983); Oestberg, Патент США № 4634664; и Engleman et al., Патент США № 4634666, использование трансгенных мышей, включающих гены человеческого иммуноглобулина (см., например, Lonberg et al., WO93/12227 (1993); US 5877397, US 5874299, US 5814318, US 5789650, US 5770429, US

5661016, US 5633425, US 5625126, US 5569825, US 5545806, Nature 148, 1547-1553 (1994), Nature Biotechnology 14, 826 (1996), Kucherlapati, WO 91/10741 (1991) и методы фагового дисплея (см., например, Dower et al., WO 91/17271 и McCafferty et al., WO 92/01047, US 5877218, US 5871907, US 5858657, US 5837242, US 5733743 и US 5565332).

Ф. Выбор константной области

Вариабельные области тяжелой и легкой цепей химерных, гуманизированных (включая венеризованные) или человеческих антител могут быть связаны с по меньшей мере частью человеческой константной области. Выбор константной области зависит частью от того, желательны ли антитело-зависимый комплемент и/или клеточно-опосредованная цитотоксичность. Например, человеческие изотипы IgG1 и IgG3 обладают комплемент-опосредованной цитотоксичностью, а человеческие изотипы IgG2 и IgG4 ей не обладают. Константные области легкой цепи могут быть лямбда или каппа. Для иммунотерапии против злокачественного новообразования или патогена, не экспрессирующего TIGIT, часто предпочтительны человеческие IgG2 или IgG4 или аттенуированная форма человеческого IgG1 со сниженной эффекторной функцией. Для человеческого IgG4 часто предпочтительно включение S228P (Eu нумерация) генно-инженерной мутации на тяжелой цепи для предотвращения обмена Fab-фрагментами. Однако для элиминации раковых клеток, экспрессирующих TIGIT (например, из Т-клеточных или NK-клеточных опухолей) или для иммуносупрессии часто предпочтительны человеческие IgG1 или IgG3.

Человеческие константные области демонстрируют аллотипические вариации и изоаллотипические вариации у разных индивидуумов, то есть константные области могут отличаться у разных индивидуумов по одному или нескольким полиморфным положениям. Изоаллотипы отличаются от аллотипов тем, что белки сыворотки, распознающие изоаллотип, связываются с не-полиморфной областью одного или нескольких других изотипов. Ссылка на человеческую константную область включает константную область с любым природным аллотипом или любой пермутацией остатков, занимающих полиморфные положения в природных аллотипах.

Одна или несколько аминокислот на амино или карбокси конце легкой и/или тяжелой цепи, такие как С-концевой лизин тяжелой цепи, может отсутствовать или может быть преобразована в части или во всех из этих молекул. Замены могут быть в константных областях для снижения или повышения эффекторной функции, такой как комплемент-опосредованная цитотоксичность или ADCC [см., например, Winter et al., Патент США № 5624821; Tso et al., Патент США № 5834597 и Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:4005, 2006) или для продления периода полужизни в организме человека (см., например, Hinton et al., J. Biol. Chem. 279:6213, 2004). Иллюстративные замены включают Gln в положении 250 и/или Leu в положении 428 (Eu нумерация) для увеличения периода полужизни антитела.

Некоторые антитела по изобретению конструируют путем введения мутации(мутаций) в константной области для получения пониженных эффекторных функций, таких как CDC и ADCC или ADCP, по сравнению с таким же антителом без мутации(мутаций). Предпочтительно каждая или все из этих эффекторных функций снижаются по меньшей мере на 50, 75, 90 или 95% по сравнению с антителами без мутации. Представленные примеры показывают, как можно измерить CDC. Другие анализы описаны в Shields et al, 2001 J. Biol. Chem., Vol. 276, p 6591-6604; Chappel et al, 1993 J. Biol. Chem., Vol 268, p 25124-25131; Lazar et al, 2006 PNAS, 103; 4005-4010.

Замена любого или всех положений 234, 235, 236 и/или 237 снижает аффинность к Fcγ рецепторам, в частности, к FcγRI рецептору (см., например, US 6624821). Аланин является предпочтительным остатком для замены, и L234A/L235A является предпочтительной двойной мутацией для снижения эффекторной функции. Другие комбинации мутаций с пониженными эффекторными функциями включают L234A/L235A/ G237A, E233P/L234V/L235A/G236, A327G/A330S/P331S, K322A, L234A и L235A, L234F/L235E/P331S. Необязательно, положения 234, 236 и/или 237 в человеческом IgG2 заменены аланином, а положение 235 глутамином (см., например, US 5624821). Две аминокислотные замены в сайте связывания комплемента C1q в положениях 330 и 331 (EU-индекс) уменьшают фиксацию комплемента (см. Tao et al., J. Exp. Med. 178:661 (1993) и Canfield and Morrison, J. Exp. Med. 173:1483 (1991)). Замена в человеческом IgG1 или IgG2 остатков в положениях 233-236 и в IgG4 остатков в положениях 327, 330 и 331 сильно снижает ADCC и CDC (см., например, Armour KL. et al., 1999 Eur J Immunol. 29(8):2613-24 и Shields RL. et al., 2001. J Biol Chem. 276(9):6591-604). N297A, N297Q или N297G (Eu нумерация) мутации снижают гликозилирование и, соответственно, эффекторные функции.

Г. Экспрессия рекомбинантных антител

Химерные, гуманизированные (включая венеризованные) и человеческие антитела, как правило, получают путем рекомбинантной экспрессии. Рекомбинантные полинуклеотидные конструкции типично включают контролируемую экспрессию последовательности, функционально связанную с кодирующими последовательностями цепей антитела, включая природно-ассоциированные или гетерологичные промоторные области. Предпочтительно контролирующие экспрессию последовательности представляют собой эукариотические промоторные системы в векторах, способных трансформировать или трансфицировать эукариотические клетки-хозяева. После введения вектора подходящему хозяину этого хозяина поддерживают в условиях, подходящих для высокого уровня экспрессии нуклеотидных последова-

тельностей, и осуществляют сбор и очистку рекомбинантных антител.

Клетки млекопитающего являются предпочтительным хозяином для экспрессии нуклеотидных сегментов, кодирующих иммуноглобулины или их фрагменты. См. Winnacker, *From Genes to Clones*, (VCH Publishers, NY, 1987). Различные подходящие клеточные линии-хозяева, способные секретировать интактные гетерологичные белки, были разработаны в данной области, и они включают СНО клеточные линии, различные COS клеточные линии, HeLa клетки, НЕК293 клетки, L клетки и не продуцирующие антитела миеломы, включая Sp2/0 и NS0. Предпочтительно клетки являются нечеловеческими. Векторы экспрессии для этих клеток могут включать контролирующие экспрессию последовательности, такие как точка начала репликации, промотор, энхансер (Queen et al., *Immunol. Rev.* 89:49 (1986)), и необходимые сайты обработки информации, такие как сайты связывания рибосом, сайты сплайсинга РНК, сайты полиаденилирования и последовательности терминаторов транскрипции. Предпочтительными контролируемыми экспрессию последовательностями являются промоторы, происходящие из эндогенных генов, цитомегаловируса, SV40, аденовируса, бычьего папилломавируса и т.п. См. Co et al., *J. Immunol.* 148:1149 (1992).

После того, как антитела экспрессированы, они могут быть очищены в соответствии со стандартными процедурами, известными в данной области техники, включая ВЭЖХ очистку, колоночную хроматографию, гель-электрофорез и т.п. (см. в общем Scopes, *Protein Purification* (Springer-Verlag, NY, 1982)).

IV. Терапевтические применения

Антитела могут использоваться для усиления иммунных реакций при лечении злокачественного новообразования и инфекционных заболеваний. Расстройства, поддающиеся лечению антителами по изобретению, включают, без ограничения, рак, включая гематологические злокачественные опухоли и солидные опухоли. Такие раковые опухоли могут экспрессировать или не экспрессировать TIGIT или CD155. Антитела к TIGIT эффективны против злокачественного новообразования, не экспрессирующего TIGIT, поскольку ингибирование взаимодействия TIGIT с CD155 стимулирует иммунный ответ против таких видов злокачественного новообразования. Примеры гематологических злокачественных новообразований включают лейкозы, лимфомы и миеломы, включая острый миелоидный лейкоз, Т-клеточный лейкоз взрослых, Т-клеточный крупногранулярный лимфоцитарный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелолейкоз, острый моноцитарный лейкоз, лимфому Ходжкина и не-ходжкинскую лимфому и множественную миелому. Примеры солидных опухолей включают, без ограничения, рак яичников, рак эндометрия, рак молочной железы, рак легких (мелкоклеточный или немелкоклеточный), рак толстой кишки, рак предстательной железы, рак шейки матки, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак пищевода, гепатоцеллюлярную карциному (рак печени), почечноклеточную карциному (рак почки), опухоли головы и шеи, мезотелиому, меланому, саркомы и опухоли головного мозга (например, глиомы, такие как глиобластомы)

Способы по изобретению можно осуществить на практике в условиях адьювантной терапии. "Условия адьювантной терапии" относится к клинической ситуации, когда индивид имеет историю пролиферативного заболевания, особенно злокачественного новообразования, и обычно (но не обязательно) отвечал на лечение, которое включает, но не ограничивается этим, хирургию, лучевую терапию и/или химиотерапию. Однако из-за истории пролиферативного заболевания эти индивиды считаются подверженными риску развития этого заболевания. Лечение или введение в "условиях адьювантной терапии" относится к последующему способу лечения. В некоторых вариантах осуществления в настоящей заявке представлен способ для лечения или осуществления профилактики злокачественного новообразования, включающий введение индивиду, имеющему рак или повышенный риск развития злокачественного новообразования, терапевтически эффективного количества любого из антител, раскрытых в настоящей заявке в условиях адьювантной терапии.

Способы, представленные в настоящей заявке, также можно осуществлять в "не-адьювантных условиях", то есть способ можно осуществить до первичной/радикальной терапии. В некоторых аспектах индивид ранее проходил лечение. В других аспектах индивид ранее не проходил лечение. В некоторых аспектах лечение представляет собой терапию первой линии. В некоторых вариантах осуществления в настоящей заявке представлен способ для лечения или осуществления профилактики злокачественного новообразования, включающий введение индивиду, имеющему рак или повышенный риск развития злокачественного новообразования, терапевтически эффективного количества любого из антител, раскрытых в настоящей заявке, в не-адьювантных условиях.

Другие расстройства, которые можно лечить антителами по изобретению, включают инфекционные заболевания, вызванные вирусами, бактериями, грибами, простейшими и другими патогенами (например, вирус гепатита (А, В или С), вирус герпеса (например, VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II, и CMV, вирус Эпштейна-Барра), аденовирус, вирус гриппа, флавивирусы, эховирус, риновирус, вирус Коксаки, коронавирус, респираторный синцитиальный вирус, вирус эпидемического паротита, ротавирус, вирус кори, вирус краснухи, парвовирус, вирус коровой оспы, HTLV вирус, вирус денге, папилломавирус, вирус моллюска, полиовирус, вирус бешенства, JC вирус, ВИЧ, ВСГ и вирус арбовирусного энцефалита, хламидии, бактерии риккетсии, микобактерии, стафилококки, стрептококки, пневмококки, менингококки и гонококки, клебсиелла, протеус, сerratия, псевдомонас, легионелла, дифтерийная палочка, палочка

сальмонеллы, бактерии, вызывающие холеру, столбняк, ботулизм, сибирскую язву, чуму, лептоспироз и болезнь Лайма.

А. Введение антител

Антитела, описанные в настоящей заявке, вводят в эффективном режиме, что означает дозировку, способ введения и частоту введения, которые задерживают начало развития, уменьшают тяжесть, ингибируют дальнейшее ухудшение и/или улучшают по меньшей мере один признак или симптом расстройства. Если индивид уже страдает от расстройства, режим можно назвать терапевтически эффективным режимом. Если у индивида повышенный риск заболевания по сравнению с общей популяцией, но он еще не испытывает симптомов, режим можно назвать профилактически эффективным режимом. В некоторых случаях терапевтическая или профилактическая эффективность может наблюдаться у отдельного индивида относительно исторических контролей или опыта прошлого у того же индивида. В других случаях терапевтическая или профилактическая эффективность может быть продемонстрирована в доклинических или клинических испытаниях в популяции получающих лечение индивидов по сравнению с контрольной популяцией не получающих лечение индивидов.

В некоторых аспектах любой из описанных в настоящей заявке способов включает введение терапевтически эффективного количества одного или нескольких антител, описанных в настоящей заявке, индивидам, нуждающимся в этом. Используемый в настоящей заявке термин "терапевтически эффективное количество" или "терапевтически эффективная доза" противораковой терапии (такой как любое из антител против TIGIT, описанных в настоящей заявке) представляет собой количество, достаточное для получения полезных или желаемых результатов. Для терапевтического применения полезные или желаемые результаты включают клинические результаты, такие как уменьшение одного или нескольких симптомов, вызванных злокачественным новообразованием, повышение качества жизни индивидов, страдающих от злокачественного новообразования, уменьшение дозы других лекарственных средств, необходимых для лечения злокачественного новообразования, повышение эффекта другого лекарственного средства, например, путем нацеливания, задержки прогрессирования заболевания и/или продления выживания. Эффективную дозу можно вводить в виде одного или нескольких введений. Для целей настоящего изобретения эффективная дозировка противораковой терапии представляет собой количество, достаточное для осуществления терапевтического или профилактического лечения непосредственно или опосредованно. Как понимается в клиническом контексте, терапевтически эффективная доза противораковой терапии может достигаться или не достигаться в сочетании с другой противораковой терапией.

Иллюстративные дозы для любого из антител, описанных в настоящей заявке, составляют около 0,1-20 мг/кг или 0,5-5 мг/кг массы тела (например, около 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 г, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 мг/кг) или 10-1500 мг (например, любая доза из меньше чем 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400 или 1500 мг или больше, включая значения между этими цифровыми значениями), в виде фиксированной дозы. Доза зависит от состояния индивида и ответа на предшествующее лечение, если оно имело место, независимо от того, является лечение профилактическим или терапевтическим, и от того, является расстройством острым или хроническим, помимо прочего.

Введение может быть парентеральным, внутривенным, пероральным, подкожным, интраартериальным, интракраниальным, интраокулярным, интраперитонеальным, интратуморальным, местным, интраназальным или внутримышечным. Предпочтительным является введение в системный кровоток путем внутривенного или подкожного введения. Внутривенное введение можно осуществить, например, путем инфузии в течение периода, такого как 30-90 мин.

Частота введения зависит от периода полужизни антитела в кровотоке, состояния индивида и способа введения, среди прочего. Частота может быть ежедневной, еженедельной, ежемесячной, ежеквартальной или с нерегулярными интервалами в ответ на изменения состояния индивида или прогрессирование расстройства, подвергаемого лечению. В качестве примера, частота для внутривенного введения представляет собой введение от одного раза в неделю до одного раза в квартал в ходе непрерывного периода лечения, хотя также возможно более или менее частое введение. Для подкожного введения в качестве примера можно указать частоту введения от одного раза в день до одного раза в месяц, хотя возможно более или менее частое введение.

Количество вводимых доз зависит от того, является ли заболевание острым или хроническим, а также от ответа расстройства на лечение. Для острых расстройств или острых обострений хронических расстройств часто бывает достаточно от 1 до 10 доз. Иногда одна болюсная доза, необязательно в виде дробных доз, достаточна при остром расстройстве или остром обострении хронического расстройства. Лечение может повторяться при рецидиве острого расстройства или острого обострения. При хронических заболеваниях антитело можно вводить через регулярные промежутки времени, например, еженедельно, раз в две недели, раз в месяц, раз в квартал, раз в шесть месяцев в течение по меньшей мере 1, 5 или 10 лет или в течение жизни индивида.

Лечение, включающее антитело против TIGIT, может облегчить заболевание, увеличивая среднюю выживаемость без прогрессирования или общее время выживания пациентов со злокачественным новообразованием по меньшей мере на около 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47,

48, 49%, но предпочтительно по меньшей мере на около 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или даже 100%, по сравнению с контрольными индивидами, или увеличить любое время из указанных на 2 недели, 1, 2 или 3 месяца, или предпочтительно на 4 или 6 месяцев, или даже на 9 месяцев или на год. Кроме того или альтернативно, лечение, включающее анти-TIGIT антитело, может повысить процент пациентов с полным ответом, частичным ответом или объективным ответом (полный + частичный) по меньшей мере на около 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49%, но предпочтительно по меньшей мере на около 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или даже 100%, по сравнению с контрольными индивидами. Контрольные индивиды принимают то же лечение, что и индивиды, принимающие анти-TIGIT антитело, за исключением анти-TIGIT антитела. Таким образом, контрольные индивиды могут принимать только плацебо или комбинацию плацебо и некоторого химиотерапевтического средства отличного от анти-TIGIT антитела, если такое средство также принимают индивиды, принимающие анти-TIGIT антитело.

Анти-TIGIT антитела, раскрытые в настоящей заявке, могут усилить NK-клеточно-опосредованную цитотоксичность CD155-экспрессирующих клеток (таких как, но не ограничиваясь этим, K562 клетки), на любую величину из около 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35% или больше по сравнению с уровнем NK-клеточно-опосредованной цитотоксичности CD155-экспрессирующих клеток в отсутствие одного из анти-TIGIT антител, раскрытых в настоящей заявке.

Как правило, в клинических испытаниях (например, в фазе II, в фазе II/III или в фазе III) увеличение средней выживаемости без прогрессирования и/или частоты ответа индивидов, получавших антитело против TIGIT, по сравнению с контрольной группой индивидов статистически значимо, например, на уровне $p=0,05$ или $0,01$ или даже $0,001$. Проценты пациентов с полным и частичным ответом определяются объективными критериями, обычно используемыми в клинических испытаниях для лечения злокачественного новообразования, например, перечисленными или принятыми Национальным институтом рака и/или Управлением по контролю за продуктами и лекарствами, и могут включать, например, определение объема опухоли, количества опухолей, метастазов, время выживания и качества жизни, среди прочего.

Фармацевтические композиции для парентерального введения предпочтительно являются стерильными и, по существу, изотоническими и изготавливаются в условиях GMP (правила правильного производства). Фармацевтические композиции могут быть представлены в стандартной дозированной форме (то есть доза для одного введения). Фармацевтические композиции могут быть сформулированы с использованием одного или нескольких физиологически приемлемых носителей, разбавителей, эксципиентов или вспомогательных веществ. Лекарственная форма зависит от выбранного пути введения. Для инъекций антитела могут быть сформулированы в водных растворах, предпочтительно в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Хэнкса, раствор Рингера или физиологический раствор или ацетатный буфер (чтобы уменьшить дискомфорт в месте инъекции). Раствор может содержать агенты для формулирования, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. Альтернативно, антитела могут быть в лиофилизированной форме для восстановления подходящим носителем, например стерильной апиrogenной водой, перед использованием. Концентрация антитела в жидких композициях может варьироваться примерно в пределах 10-150 мг/мл. В некоторых композициях концентрация составляет около 25-50 мг/мл.

В. Комбинированные терапии

Настоящее изобретение предусматривает применение антител против TIGIT в комбинации с одним или несколькими активными терапевтическими средствами (например, химиотерапевтическими средствами) или другими профилактическими или терапевтическими модальностями (например, облучением). В такой комбинированной терапии различные активные средства часто имеют разные взаимодополняющие механизмы действия. Такая комбинированная терапия может быть особенно предпочтительной, позволяя снизить дозу одного или нескольких средств, уменьшая или устраняя, таким образом, побочные эффекты, связанные с одним или несколькими средствами. Кроме того, такая комбинированная терапия может иметь синергический терапевтический или профилактический эффект на основное заболевание, расстройство или состояние.

Используемый в настоящей заявке термин "комбинация" означает терапевтические средства, которые можно вводить отдельно, например, сформулированными отдельно для отдельного введения (например, как может быть предусмотрено в наборе), и терапевтические средства, которые можно вводить вместе в одной композиции (т.е. "совместная композиция").

В некоторых вариантах осуществления любое из антител против TIGIT, раскрытых в настоящей заявке, вводят или применяют последовательно, например, когда одно средство вводят перед одним или несколькими другими средствами. В других вариантах осуществления антитела вводят одновременно, например, когда два или более средств вводят примерно в одно и то же время; два или более средств могут присутствовать в двух или более отдельных композициях или объединены в одну композицию (то

есть совместную композицию). Независимо от того, вводят ли два или более средств последовательно или одновременно, они считаются вводимыми в комбинации для целей настоящего изобретения.

Антитела по настоящему изобретению можно использовать в комбинации с по меньшей мере одним другим (активным) средством любым образом в соответствии с данными обстоятельствами. В одном варианте осуществления лечение по меньшей мере одним активным средством и по меньшей мере одним антителом против TIGIT по настоящему изобретению поддерживают в течение определенного периода времени. В другом варианте осуществления лечение по меньшей мере одним активным средством уменьшают или прекращают (например, когда индивид стабилен), в то время как лечение антителом против TIGIT по настоящему изобретению поддерживают при постоянном режиме введения. В еще одном варианте осуществления лечение по меньшей мере одним активным средством уменьшают или прекращают (например, когда индивид стабилен), тогда как лечение антителом против TIGIT по настоящему изобретению уменьшают (например, более низкая доза, менее частое введение или более короткий режим лечения). В еще одном варианте осуществления лечение по меньшей мере одним активным средством уменьшают или прекращают (например, когда индивид стабилен), и лечение антителом против TIGIT по настоящему изобретению увеличивают (например, более высокая доза, более частое введение или более длительный режим лечения). В еще одном варианте осуществления лечение по меньшей мере одним активным средством поддерживают, а лечение антителом против TIGIT по настоящему изобретению уменьшают или прекращают (например, более низкая доза, менее частое введение или более короткий режим лечения). В еще одном варианте осуществления лечение по меньшей мере одним активным средством и лечение антителами против TIGIT по настоящему изобретению уменьшают или прекращают (например, более низкая доза, менее частое введение или более короткий режим лечения).

Лечение антителами по изобретению можно сочетать с другими лечениями, эффективными против рассматриваемого расстройства. При использовании в лечении пролиферативного состояния, злокачественного новообразования, опухоли или предраковых заболеваний, расстройств или состояний антитела по изобретению можно сочетать с химиотерапией, облучением (например, локализованной лучевой терапией или общей лучевой терапией тела), лечением стволовыми клетками, хирургией или лечением другими биологическими препаратами.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам подавления опухоли или роста опухоли, включающим введение антител против TIGIT, описанных в настоящей заявке, в сочетании с ингибитором сигнальной трансдукции (STI) для достижения аддитивного или синергического подавления роста опухоли. Используемый в настоящей заявке термин "ингибитор сигнальной трансдукции" относится к средству, которое селективно ингибирует одну или несколько стадий в сигнальном пути. Ингибиторы сигнальной трансдукции (STIs) по настоящему изобретению включают: (i) ингибиторы BCR-Abl-киназы (например, иматиниб мезилат (GLEEVEC)); (ii) ингибиторы рецепторов эпидермального фактора роста (EGF), в том числе ингибиторы киназы и антитела; (iii) ингибиторы HER-2/неи-рецепторов (например, HERCEPTIN); (iv) ингибиторы киназ семейства Akt или пути Akt (например, рапамицин); (v) ингибиторы киназы клеточного цикла (например, флавопиридол); и (vi) ингибиторы фосфатидилинозиткиназы. Средства, участвующие в иммуномодуляции, также можно использовать в комбинации с антителами против TIGIT, описанными в настоящей заявке, для подавления роста опухоли у раковых пациентов.

Примеры химиотерапевтических средств включают, но не ограничиваются этим, алкилирующие средства, такие как тиотепа и циклофосфамид; алкилсульфонаты, такие как бусульфан, имсульфан и пирросульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилендиофосфороамид и триметилломелаламид; азотистые иприты, такие как хиорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлоретамин, гидрохлорид мехлоретамин оксид, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урацилпиприт; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, ранимустин; антибиотики, такие как аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, калихеамицин, карбабицин, каминомицин, карцинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубин, деторубин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубин, эпирубин, эзорубин, идарубин, марцелломицин, митомицины, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиромицин, пуромицин, квеламицин, родорубин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; пуриновые аналоги, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиампирин, тиогуанин; пиримидиновые аналоги, такие как анцитабин, азацидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флуксуридин, 5-FU; андрогены, такие как каластоун, дромонастанол пропионат, эпителиотенол, мепитиостан, тестолактон; средства, угнетающие функции надпочечников, такие как аминоглутетимид, митотан, трилостан; заменитель фолиевой кислоты, такой как фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамидгликозид; аминоклевулиновая кислота; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; элформитин; эллиптический ацетат; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лонидамин; митогуазон; митоксан-

трон; мопидамол; нитракрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; подофиллиновая кислота; 2-этилгидразид; прокарбазин; разоксан; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновая кислота; триазиквон; 2,2',2''-трихлортриэтиламин; уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид (Ара-С); циклофосфамид; тиотепа; токсойды (например, таксаны), например паклитаксел, таксол и доксетаксел; хлорамбуцил; гемцитабин; 6-тигуанин; меркаптопурин; метотрексат; платина и платиновые координационные комплексы, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; этопозид (VP-16); ифосфамид; митомицин С; митоксантрон; винкристин; винорелбин; навелбин; новантрон; тенипозид; дауномицин; аминоптерин; кселода; ибандронат; СРТ11; ингибиторы топоизомеразы; камптотецины, диформетилорнитин (DMFO); ретиноевая кислота; эсперамицины; капецитабин; антиметаболиты (например, азатиоприн); антрациклины; растительные алкалоиды (включая, например, алкалоиды барвинка); и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеуказанных.

Химиотерапевтические средства также включают антигормональные средства, которые действуют как регулирующие или ингибирующие гормональное воздействие на опухоли, такие как антиэстрогены, включая, например, тамоксифен, ралоксифен, ингибирующие ароматазу 4(5)-имидазолы, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен и торемифен; и антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гозерелин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеуказанных. В некоторых вариантах осуществления комбинированная терапия включает введение гормона или соответствующего гормонального средства.

Дополнительные способы лечения, которые можно использовать в сочетании с антителами против TIGIT, описанными в настоящей заявке, включают лучевую терапию, моноклональное антитело против опухолевого антигена, комплекс моноклонального антитела и токсина, Т-клеточный адъювант, трансплантацию костного мозга или использование антиген-презентирующих клеток (например, терапия дендритными клетками) или клеточных терапий. Используемый в настоящей заявке термин "клеточная терапия" относится к любой терапии, которая включает введение клеток в целях достижения желаемого терапевтического эффекта, например, для восстановления поврежденных или пересыщенных клеточных популяций или тканей взрослых или для усиления иммунного ответа против патогена или пролиферативной клетки (такой как раковая клетка). В других вариантах осуществления клеточная терапия включает введение недифференцированной клетки (такой как стволовая клетка или другая мульти- или тотипотентная клетка), способной дифференцироваться в конкретный тип клеток, необходимый для достижения желаемого терапевтического эффекта, например, восстановления поврежденных или пересыщенных клеточных популяций или тканей взрослых или усиления иммунного ответа против патогена или пролиферативной клетки (такой как раковая клетка). В некоторых вариантах осуществления антитела по изобретению можно также вводить с инфильтрирующими опухоль Т-клетками или природными киллерами, которые необязательно были размножены или выбраны для хоуминга к опухоли *ex vivo*. Антитело по изобретению способствует активации этих клеток.

Предпочтительная комбинация представляет собой антитело по изобретению с вторым антителом, направленным на поверхностный антиген, предпочтительно экспрессируемый на раковых клетках по сравнению с контрольной нормальной тканью. Некоторые примеры антител, которые можно вводить в комбинированной терапии при помощи антител по изобретению для лечения злокачественного новообразования, включают Герцептин® (трастузумаб) против антигена HER2, Авастин® (бевацизумаб) против VEGF или антитела к рецептору EGF, такие как (Erbix®), цетуксимаб и Vectibix® (панитумумаб). Другие средства, которые можно вводить, включают антитела или другие ингибиторы любых из PD-1, PD-L1, CTLA-4, 4-1BB, BTLA, VISTA, TIM-3 и LAG-3; или другие ингибиторы пути передачи сигнала, например, ингибиторы mTOR и GSK3β; и цитокины, например, интерферон-γ, IL-2 и IL-15. Некоторые конкретные примеры дополнительных средств включают: ипилимумаб, пазопаниб, сунитиниб, дазатиниб, пембролизумаб, INCRO24360, дабрафениб, траметиниб, атезолизумаб (MPDL3280A), рарцева, кобиметиниб и ниволумаб. Выбор второго антитела или другого средства для комбинированной терапии зависит от лечения злокачественного новообразования. Необязательно, рак тестируют на экспрессию или преимущественную экспрессию антигена для направления выбора подходящего антитела. Изотипом второго антитела предпочтительно является человеческий IgG1 для промотирования эффекторных функций, таких как ADCC, CDC и фагоцитоз.

Антитела по изобретению также можно вводить с вакцинами, вызывающими иммунный ответ против злокачественного новообразования. Такой иммунный ответ усиливается антителом по изобретению. Вакцина может включать антиген, экспрессируемый на поверхности злокачественного новообразования, или его фрагмент, эффективный для индукции иммунного ответа, необязательно связанный с молекулой-носителем.

В настоящем изобретении рассматривается применение антител против TIGIT, описанных в настоящей заявке, в сочетании с ингибиторами иммунных контрольных точек.

Огромное количество генетических и эпигенетических изменений, характерных для всех видов злокачественного новообразования, обеспечивает разнообразный набор антигенов, которые иммунная сис-

тема может использоваться для различения опухолевых клеток от их нормальных аналогов. В случае Т-клеток, максимальная амплитуда (например, уровни продукции или пролиферации цитокинов) и качество (например, тип генерируемого иммунного ответа, такой как картина продукции цитокинов) ответа, который инициируется с помощью распознавания антигена Т-клеточным рецептором (TCR), регулируется балансом между костимуляторными и ингибиторными сигналами (иммунными контрольными точками). В нормальных физиологических условиях иммунные контрольные точки имеют решающее значение для профилактики аутоиммунитета (то есть поддержания самоустойчивости), а также для защиты тканей от повреждений, когда иммунная система реагирует на патогенную инфекцию. Экспрессия белков иммунных контрольных точек может быть дисрегулирована опухолями как важный механизм иммунорезистентности.

Примеры иммунных контрольных точек (лигандов и рецепторов), некоторые из которых селективно повышающе регулируются в различных типах опухолевых клеток, которые являются кандидатами для блокады, включают PD-1 (белок запрограммированной клеточной гибели 1); PD-L1 (лиганд запрограммированной клеточной гибели-1); BTLA (В и Т лимфоцитарный аттенуатор); CTLA-4 (цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный антиген 4); TIM-3 (Т-клеточный мембранный белок 3); LAG-3 (ген активации лимфоцитов 3); V-доменный иммуноглобулиновый супрессор Т-клеточной активации (VISTA); CD96; A2aR (аденозиновый A2a рецептор); A2bR (аденозиновый A2b рецептор); CD73 (экто-5'-нуклеотидаза); CD39 (ENTPD1, NTPDase1); Аргиназу; индоламин-пиррол 2,3-диоксигеназу (IDO); триптофан 2,3-диоксигеназу (TDO); и ингибирующие рецепторы киллеров, которые можно подразделить на два класса на основании их структурных особенностей: i) киллерные иммуноглобулинподобные рецепторы (KIRs), и ii) лектиновые рецепторы С-типа (члены семейства трансмембранных рецепторов II типа). Другие иммунные контрольные точки, которые не были так хорошо определены, были описаны в литературе, включая как рецепторы (например, 2B4 (также известный как CD244) рецептор), так и лиганды (например, некоторые ингибиторные лиганды В7 семейства, такие В7-Н3 (также известный как CD276) и В7-Н4 (также известный как В7-S1, В7х и VCTN1)). См. Pardoll, (April 2012) Nature Rev. Cancer 12:252-64.

Настоящее изобретение предусматривает использование любого из антител против TIGIT, описанных в настоящей заявке, в сочетании с ингибиторами вышеуказанных рецепторов и лигандов иммунных контрольных точек, а также еще не описанных рецепторов и лигандов иммунных контрольных точек. В настоящее время доступны некоторые модуляторы иммунных контрольных точек, в то время как другие находятся в последней стадии разработки. Для иллюстрации, когда оно было одобрено для лечения меланомы в 2011 г., полностью гуманизированное моноклональное антитело CTLA-4 ипилимумаб (YERVOY, Bristol-Myers Squibb) стало первым ингибитором иммунной контрольной точки, получившим официальное одобрение в США. Слитые белки, содержащие CTLA-4 и антитело (CTLA-4-Ig, абатацепт (ORENCIA, Bristol-Myers Squibb)), использовали для лечения ревматоидного артрита, и было показано, что другие слитые белки эффективны у пациентов с трансплантацией почек, которые сенсбилизваны к вирусу Эпштейна Барра. Антитела против PD-1 находятся в стадии разработки (например, ниволумаб (Bristol-Myers Squibb) и пембролизумаб (ламбролизумаб) (Merck)), а также антитела против PD-L1 (например, MPDL3280A (Roche)). Ниволумаб и пембролизумаб показали потенциал у пациентов с меланомой, раком легких и почек.

Подобную комбинированную терапию можно использовать для лечения или профилактики инфекционных заболеваний, таких как вирусные, бактериальные, грибковые и паразитарные заболевания, расстройства и состояния, а также связанных с ними расстройств. Например, антитело по изобретению можно комбинировать с антителом, направленным против патогена, или с вакциной против патогена, например, с паливизумабом против вируса саркомы Рауса. Вакцина может представлять собой белок патогена или его фрагмент, эффективный для индукции иммунного ответа. Антитело по изобретению усиливает иммунный ответ антитела или вакцины, направленной против патогена. Антитело по изобретению также можно вводить с Т-клетками или природными киллерными клетками, размноженными *ex vivo*.

Такая комбинированная терапия включает противовирусные средства, нацеленные на различные стадии жизненного цикла вируса и имеющие различные механизмы действия, включая, но не ограничиваясь этим, следующие: ингибиторы декапсидации вируса (например, амантадин и римантидин); ингибиторы обратной транскриптазы (например, ацикловир, зидовудин и ламивудин); средства, нацеленные на интегразу; средства, которые блокируют присоединение факторов транскрипции к вирусной ДНК; средства (например, антисмысловые молекулы), которые влияют на трансляцию (например, фомивирсен); средства, которые модулируют функцию трансляции/рибозимов; ингибиторы протеазы; модуляторы сборки вируса (например, рифампицин); антиретровирусные средства, такие как, например, нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (например, азидотимидин (AZT), ddI, ddC, 3TC, d4T); нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (например, эфавиренц, невирапин); нуклеотидные ингибиторы обратной транскриптазы; и средства, которые предотвращают высвобождение вирусных частиц (например, занамивир и озелтамивир). Для лечения и/или профилактики некоторых вирусных инфекций (например, ВИЧ) часто необходима группа ("коктейль") противовирусных средств.

Другие противовирусные средства, предназначенные для использования в сочетании с любым из антител против TIGIT, описанных в настоящей заявке, включают, но не ограничиваются этим, следующие: абакавир, адефовир, амантадин, ампренавир, амплиген, арбидол, атазанавир, атрипла, боцепревиретет, цидофовир, комбривир, дарунавир, делавирдин, диданозин, докозанол, эдоксидин, эмтрицитабин, энфувиртид, энтекавир, фамцикловир, фосампренавир, фоскарнет, фосфонет, ганцикловир, ибацитабин, иминовир, идоксуридин, имиквимод, индинавир, инозин, различные интерфероны (например, пегинтерферон альфа-2а), лопинавир, лоризид, маравинок, мороксидин, метизазон, нелфинавир, нексавир, пенцикловир, перимивир, плеконарил, подофиллотоксин, ралтегравир, рибавирин, ритонавир, пираимидин, саквинавир, ставудин, телоправир, тенофовир, типранавир, трифлуридин, тризивир, тромантадин, трувада, валацикловир, валганцикловир, викривирок, видарабин, вирамидин и залцитабин.

Настоящее изобретение рассматривает использование любого из антител против TIGIT, раскрытых в настоящей заявке, в сочетании с противопаразитарными средствами. Такие средства включают, но не ограничиваются этим, тиабендазол, пирантел памоат, мебендазол, празиквантел, никлозамид, битионол, оксамникин, метриконат, ивермектин, албендазол, эфлорнитин, меларсопрол, пентамидин, беннидазол, нифуртимокс и нитроимидазол. Специалистам в данной области известны другие средства, которые могут оказаться полезными для лечения паразитарных расстройств.

Варианты осуществления настоящего изобретения предполагают использование любого из антител против TIGIT, раскрытых в настоящей заявке, в сочетании со средствами, полезными для лечения или профилактики бактериальных расстройств. Антибактериальные средства можно классифицировать различным образом, в том числе на основе механизма действия, на основе химической структуры и на основе спектра активности. Примеры антибактериальных средств включают средства, которые нацелены на клеточную стенку бактерий (например, цефалоспорины и пенициллины) или клеточную мембрану (например, полимиксины), или вмешиваются в действие основных бактериальных ферментов (например, сульфонамиды, рифамицины и хинолины). Большинство антибактериальных средств, которые направлены на синтез белка (например, тетрациклины и макролиды), являются бактериостатическими, тогда как средства, такие как аминогликозид, являются бактерицидными. Другой способ классификации антибактериальных средств основан на их целевой специфичности; средства "узкого спектра" нацелены на конкретные типы бактерий (например, грамположительные бактерии, такие как стрептококк), тогда как средства "широкого спектра" обладают активностью в отношении более широкого круга бактерий. Специалистам в данной области известны типы антибактериальных средств, подходящих для применения при конкретных бактериальных инфекциях.

Варианты осуществления настоящего изобретения предусматривают использование любого из антител против TIGIT, описанных в настоящей заявке, в сочетании со средствами, полезными для лечения или профилактики грибковых расстройств. Противогрибковые средства включают полиены (например, амфотерицин, нистатин и пимарицин); азолы (например, флуконазол, итраконазол и кетоконазол); аллиламины (например, нафтифин и тербинафин) и морфолины (например, аморолфин); и антиметаболиты (например, 5-фторцитозин).

Настоящее изобретение охватывает фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные средств (и представителей классов средств), перечисленных выше.

Антитела против TIGIT можно использовать в сочетании с любым из вторых антител или средств, описанных для использования в совместном лечении в качестве компонентов фармацевтической композиции. В фармацевтической композиции средства могут быть объединены с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями, как описано.

V. Другие варианты применения

Антитела против TIGIT можно использовать для детекции TIGIT в контексте клинической диагностики или лечения или в исследованиях. Например, антитела можно использовать для детекции присутствия TIGIT на Т-клетках, природных киллерных клетках и раковых клетках в качестве признака того, что индивид страдает от злокачественного новообразования или инфекционного заболевания, поддающегося лечению. Экспрессия TIGIT на Т-клетках, природных киллерных клетках и/или раковых клетках индивида, страдающего злокачественным новообразованием или инфекционным заболеванием, также свидетельствует о том, что рак или инфекционное заболевание поддаются лечению антителами по настоящему изобретению. Антитела также могут продаваться в качестве исследовательских реагентов для лабораторных исследований для детекции Т-клеток, природных киллерных клеток и злокачественных клеток и их реакции на различные стимулы. В таких применениях моноклональные антитела могут быть мечены флуоресцентными молекулами, спин-мечеными молекулами, ферментами или радиоизотопами и могут быть представлены в виде набора со всеми необходимыми реагентами для осуществления анализа на TIGIT. Антитела также можно использовать для очистки TIGIT, например, при помощи аффинной хроматографии.

VI. Наборы

Антитела против TIGIT можно объединить с любым из вторых антител или средств, описанных для использования в совместном лечении в качестве компонентов набора. Изобретение, раскрытое в настоящей заявке, предусматривает один или несколько наборов, содержащих одно или несколько из описан-

ных в настоящей заявке антител, а также один или несколько фармацевтически приемлемых эксципиентов или носителей (таких как, без ограничения, фосфатно-солевые буферные растворы, вода, стерильная вода, полиэтиленгликоль, поливинилпирролидон, лецитин, арахисовое масло, кунжутное масло, эмульсии, такие как эмульсии масло/вода или эмульсии вода/масло, микроэмульсии, наноносители и различные типы смачивающих веществ). Добавки, такие как спирты, масла, гликоли, консерванты, ароматизаторы, красители, суспендирующие агенты и т.п., также могут быть включены в наборы по настоящему изобретению вместе с носителем, разбавителем или эксципиентом. В одном варианте осуществления фармацевтически приемлемый носитель, подходящий для использования в композициях антител, описанных в настоящей заявке, является стерильным, свободным от патогенов и/или иным образом безопасным для введения индивиду без риска соответствующей инфекции и других нежелательных побочных эффектов. В наборе соответствующие вещества могут быть представлены в отдельных флаконах с инструкциями для комбинирования и последующего введения или с инструкциями для отдельного введения. Набор может также включать письменные инструкции для правильной манипуляции и хранения любых антител против TIGIT, описанных в настоящей заявке.

Предполагается, что каждое максимальное числовое ограничение, приведенное в настоящем описании, включает каждое более низкое числовое ограничение, как если бы такие более низкие числовые ограничения были явно указаны в настоящей заявке. Каждое минимальное числовое ограничение, приведенное в настоящем описании, будет включать все более высокие числовые ограничения, как если бы такие более высокие числовые ограничения были явно указаны в настоящей заявке. Каждый численный диапазон, указанный в настоящем описании, будет включать в себя все более узкие числовые диапазоны, которые попадают в такой более широкий численный диапазон, как если бы такие более узкие числовые диапазоны были явно указаны в настоящей заявке.

Все патентные заявки, веб-сайты, другие публикации, номера доступа и т.п., на которые ссылаются выше или ниже, включены в качестве ссылки во всей их полноте для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация была специально и индивидуально указана для ее включения посредством ссылки. Если разные версии последовательности связывают с номером доступа в разное время, имеется в виду версия, связанная с номером доступа на действующую дату подачи настоящей заявки. Действующая дата подачи означает более раннюю, чем фактическая дата подачи, или дату подачи приоритетной заявки, ссылающейся на номер доступа, если это применимо. Подобным образом, если разные версии публикации, веб-сайта или т.п. опубликованы в разное время, имеется в виду версия, которая была недавно опубликована на действующую дату подачи заявки, если не указано иное. Любой признак, стадия, элемент, вариант осуществления или аспект изобретения можно использовать в сочетании с любым другим, если специально не указано иное.

Хотя настоящее изобретение было описано достаточно подробно при помощи иллюстрации и примера для ясности и понимания, будет очевидно, что определенные изменения и модификации могут быть реализованы в рамках прилагаемой формулы изобретения.

Примеры

В следующих примерах обсуждается получение, описание и гуманизирование моноклональных антител против человеческого TIGIT, а также представлены иллюстративные способы, при помощи которых можно определить характеристики связывания антител, описанных в настоящей заявке.

Пример 1. Экспрессия рекомбинантных человеческих белков TIGIT

Клонирование генов, мутагенез и конструирование плазмиды в этой работе осуществляли с использованием стандартных методов молекулярной биологии, таких, которые описаны в Sambrook and Russel (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd ed., 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY), Kostelny et al. (Int. J. Cancer 93:556-565, 2001) и Cole et al. (J. Immunol. 159:3613-3621, 1997).

Вектор экспрессии млекопитающего pFCm404 (фиг. 1) для продукции внеклеточной области человеческого TIGIT, слитой с Fc областью $\gamma 1$ цепи человеческого иммуноглобулина (hTIGIT-Fc; SEQ ID NO: 59), содержит следующие генетические компоненты. По направлению часовой стрелки от SalI сайта pFCm404 на фиг. 1, плазида содержит транскрипционную единицу для hTIGIT-Fc, начиная с главного предраннего промотора и энхансера (CMV-P на фиг. 1) из цитомегаловируса человека (CMV). После CMV промотора следуют кодирующие области сигнального пептида (sp; SEQ ID NO: 2), внеклеточная область человеческого TIGIT (hTIGIT; SEQ ID NO: 3), полипептидный линкер (SEQ ID NO: 4) и человеческая $\gamma 1$ Fc область (SEQ ID NO: 5), а затем следует сайт полиаденилирования гена $\gamma 1$ тяжелой цепи человека. После hTIGIT-Fc гена следуют SV40 ранний промотор (SV40-P), ген пурамицин N-ацетилтрансферазы (puro) для резистентности к пурамицину и сегмент, содержащий SV40 сайт полиаденилирования (SV40-A). И наконец, pFCm404 содержит часть плазмиды pUC19, включающую бактериальную точку начала репликации (pUC ori) и ген β лактамазы (β лактамаза). Стрелки на фигуре показывают ориентацию транскрипции. Соответствующие сайты для рестрикционных ферментов показаны на чертежах.

Кодирующую область внеклеточной области человеческого TIGIT в pFCm404 заменяли ДНК фрагментом, кодирующим внеклеточную область человеческого CD155 (hCD155; SEQ ID NO: 6), что приводило к образованию нового вектора экспрессии pFCm406 (фиг. 1). Внеклеточную область человеческого

CD155, слитую с человеческой $\gamma 1$ Fc областью (hCD155-Fc; SEQ ID NO: 7), экспрессировали из pFCm406.

Кодирующую область $\gamma 1$ Fc области между AgeI и EagI сайтами в pFCm404 заменяли ДНК фрагментом, кодирующим FLAG пептид (FLAG; SEQ ID: 8), с последующим сигналом связывания гликозил-фосфатидилинозита человеческого CD55 (GPI; SEQ ID: 9), что приводило к образованию нового вектора экспрессии pFCm407 (фиг. 1). Внеклеточную область человеческого TIGIT, слитую с FLAG и GPI (hTIGIT-GPI)-кодируемым pFCm406, экспрессировали на клеточной поверхности.

Для получения клеточных линий, стабильно продуцирующих hTIGIT-Fc и hCD155-Fc в культуральных супернатантах, векторы экспрессии pFCm404 и pFCm406, соответственно, вводили в хромосому мышинной миеломной клеточной линии NS0 (European Collection of Animal Cell Cultures, Salisbury, Wiltshire, UK). NS0 клетки выращивали в DME среде, содержащей 10% фетальную бычью сыворотку (FBS), при 37°C в 7,5% CO₂ инкубаторе. Стабильную трансфекцию в NS0 осуществляли путем электропорации, как описано в Vebbington et al. (Bio/Technology 10: 169-175, 1992). Перед трансфекцией векторы экспрессии линеализировали с использованием FspI. Примерно 10⁷ клеток трансфицировали при помощи 10 мкг линеализированной плазмиды, суспендировали в DME среде, содержащей 10% FBS, и высевали в несколько 96-луночных планшетов. Через 24 ч нанесли селективную среду (DME среда, содержащая 10% FBS и 3 мкг/мл пуромидина). Примерно через 10 дней после начала селекции культуральные супернатанты анализировали на продукцию Fc слитых белков методом ELISA с использованием козлиного антитела против человеческой гамма цепи для покрытия и HRP-конъюгированного козлиного антитела против человеческой гамма цепи для детекции Fc слитых белков.

NS0 стабильные трансфектанты, продуцирующие высокие уровни Fc слитых белков, адаптировали к Гибридома-SFM среде и размножали в ней (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) и выращивали до истощения в роллерных флаконах. После центрифугирования и фильтрации культуральный супернатант загружали на колонку с белком-A-сефарозой (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Колонку промывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS), затем Fc слитые белки элюировали с использованием 0,1 М глицина-HCl (pH 3,0). После нейтрализации при помощи 1 М Tris-HCl (pH 8) буфер элюируемых Fc слитых белков обменивали на PBS путем диализа.

Для получения клеточных линий, экспрессирующих hTIGIT-GPI на поверхности, вектор экспрессии pFCm407 стабильно трансфицировали в NS0 клетки. Экспрессию hTIGIT-GPI на клеточной поверхности контролировали методом проточной цитометрии с использованием крысиного анти-FLAG моноклонального антитела и PE-меченного козлиного анти-крысиного IgG, Fc-специфического антитела. NS0 клеточные линии, экспрессирующие высокие уровни hTIGIT-GPI на клеточной поверхности (NS0-hTIGIT), использовали для скрининга анти-TIGIT антител.

Пример 2. Генерирование и характеристика анти-TIGIT моноклональных антител

Мышиные гибридомы, продуцирующие античеловеческие TIGIT моноклональные антитела, получали на JN Biosciences (Mountain View, CA) с использованием стандартной гибридомной технологии, такой как GenomONE CF EX Cell Fusion Reagent (Cosmo Bio, Carlsbad, CA). В качестве иммуногенов использовали человеческие TIGIT-Fc слитые белки и NS0-hTIGIT клетки.

Мышиные антитела, секретированные в культуральных супернатантах гибридных клеток, подвергали серии скринингов для идентификации антител со следующими свойствами: (1) связывание с очищенным hTIGIT-Fc слитым белком, (2) связывание с NS0-hTIGIT клетками, (3) не связывание с NS0 клетками, (4) связывание с CD3⁺ Т-клетками, происходящими из фитогемагглютинин-обработанных мононуклеарных клеток периферической крови человека, и (5) блокирование связывания hCD155-Fc слитого белка с NS0-hTIGIT клетками. Первое свойство связывания с hTIGIT-Fc испытывали методом ELISA с использованием HRP-конъюгированных козлиных антител против мышинных каппа и лямбда легких цепей (SouthernBiotech, Birmingham, AL) для идентификации мышинных анти-TIGIT антител. Второе, третье и четвертое свойства исследовали методом проточной цитометрии с использованием PE-меченного козлиного анти-мышинная гамма цепь антитела (SouthernBiotech) для детекции связанных с клетками мышинных антител. Пятое свойство анализировали методом проточной цитометрии, как описано ниже. Было обнаружено, что три мышинных моноклональных антитела (TIG1, TIG2 и TIG3) обладают всеми из этих пяти свойств. TIG1, TIG2 и TIG3 моноклональные антитела очищали из культурального супернатанта гибридных клеток колоночной хроматографией с белком А, как описано выше. Изоотипы TIG1, TIG2 и TIG3 представляют собой мышинные IgG2b/каппа, IgG2a/каппа и IgG2a/каппа, соответственно.

Активность TIG1, TIG2 и TIG3 для блокирования взаимодействия между TIGIT и CD155 анализировали методом проточной цитометрии. NS0-hTIGIT клетки инкубировали с субнасыщающей концентрацией hCD155-Fc в присутствии (или в отсутствие) различных концентраций анти-TIGIT моноклонального антитела в качестве конкурента. Детекцию hCD155-Fc, связанных с NS0-hTIGIT клетками, осуществляли с использованием DyLight488-меченного козлиного античеловеческого IgG, Fc-специфического антитела (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Как показано на фиг. 2, TIG1, TIG2 и TIG3 ингибировали связывание hCD155-Fc с NS0-hTIGIT клетками дозо-зависимым образом. Полу-максимальная ингибирующая концентрация (IC₅₀) для блокирования взаимодействия между hCD155-Fc и

NS0-hTIGIT клетками составляла 49 нг/мл для TIG1, 197 нг/мл для TIG2 и 460 нг/мл для TIG3. Концентрация антител, необходимая для блокирования более чем 95% связывания CD155 с TIGIT, составляла 0,63 мкг/мл для TIG1, 1,25 мкг/мл для TIG2 и 2,5 мкг/мл для TIG3.

Пример 3. В геномное секвенирование анти-TIGIT моноклональных антител

Определение последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей (VH и VL, соответственно) мышиных анти-TIGIT антител осуществляли, следуя процедурам, описанным в Tsurushita et al (Methods 36:69-83, 2005). Тотальную РНК экстрагировали из примерно 10^7 клеток с использованием TRIzol реагента (Invitrogen, Carlsbad, CA) в соответствии с протоколом поставщика. Олиго dT-примированную кДНК для 5'-RACE синтезировали с использованием набора для кДНК амплификации SMARTer RACE (Clontech, Mountain View, CA), следуя протоколу поставщика. кДНК VH и VL амплифицировали при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР), используя Phusion ДНК полимеразу (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), с использованием 3' праймеров, которые специфически гибридизуются с мышиными константными областями тяжелой или легкой цепи (Tsurushita et al., supra) соответственно, и 5' праймера, обеспечиваемого в наборе SMARTer RACE для кДНК амплификации. Амплифицированные VH и VL гены клонировали с использованием набора для клонирования CloneJet PCR (Thermo Fisher Scientific) и подвергали секвенированию с праймерами, представленными в наборе для клонирования CloneJet PCR. Несколько VH и VL клонов секвенировали и идентифицировали уникальные последовательности, гомологичные типичным мышиным переменным областям тяжелой и легкой цепи.

Аминокислотная последовательность зрелой VH TIG1 (SEQ ID NO: 10) показана на фиг. 3. Аминокислотные последовательности CDR1, 2 и 3 областей TIG1 VH представляют собой NFGMH (SEQ ID NO: 11), FISSGSSSIYYADTVKVG (SEQ ID NO: 12) и MRLDYAMDY (SEQ ID NO: 13) соответственно.

Аминокислотная последовательность зрелой VL TIG1 (SEQ ID NO: 14) показана на фиг. 4. Аминокислотные последовательности CDR1, 2 и 3 областей TIG1 VL представляют собой RASKSISKYLA (SEQ ID NO: 15), SGSTLQS (SEQ ID NO: 16) и QQHNEYPTW (SEQ ID NO: 17) соответственно.

Аминокислотная последовательность зрелой VH TIG2 (SEQ ID NO: 18) показана на фиг. 5. Аминокислотные последовательности CDR1, 2 и 3 областей TIG2 VH представляют собой EYTMH (SEQ ID NO: 19), GINPNNGGTSYNQKFKG (SEQ ID NO: 20) и PGWYNYAMDY (SEQ ID NO: 21) соответственно.

Аминокислотная последовательность зрелой VL TIG2 (SEQ ID NO: 22) показана на фиг. 6. Аминокислотные последовательности CDR1, 2 и 3 областей TIG2 VL представляют собой KASQGVSTAVA (SEQ ID NO: 23), SASRYT (SEQ ID NO: 24) и QQHYITPWT (SEQ ID NO: 25) соответственно.

Аминокислотная последовательность зрелой VH TIG3 (SEQ ID NO: 26) показана на фиг. 7. Аминокислотные последовательности CDR1, 2 и 3 областей TIG3 VH представляют собой DYDMS (SEQ ID NO: 27), YISDGGYNTYYPDTVKG (SEQ ID NO: 28) и QILLRYFDY (SEQ ID NO: 29) соответственно.

Аминокислотная последовательность зрелой VL TIG3 (SEQ ID NO: 30) показана на фиг. 8. Аминокислотные последовательности CDR1, 2 и 3 областей TIG3 VL представляют собой KSSQSLLYSSNQKNYLA (SEQ ID NO: 31), WASTRES (SEQ ID NO: 32) и QQYHSYPWT (SEQ ID NO: 33), соответственно.

Присвоение CDR последовательностей и нумерация положений аминокислот на фиг. 3-8 представлены в соответствии с Кэбат et al. (1991). Последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 подчеркнуты на чертежах.

Пример 4. Конструирование и экспрессия гуманизованного TIG1 антитела

Гуманизацию VH и VL TIG1 осуществляли, как описано в Queen et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:10029-10033, 1989), следуя процедурам Tsurushita et al. (Methods 36:69-83, 2005). Вкратце, трехмерную молекулярную модель переменных областей TIG1 сначала конструировали с использованием алгоритма, разработанного JN Biosciences. Затем идентифицировали каркасные аминокислотные остатки, важные для образования структуры определяющих комплементарность областей (CDR) TIG1 с использованием молекулярной модели. Параллельно этому, выбирали кДНК-происходящие аминокислотные последовательности человеческих VH и VL с высокой гомологией с TIG1 VH и VL соответственно. И наконец, осуществляли прививку последовательностей CDR вместе с каркасными аминокислотными остатками, важными для поддержания CDR структуры, из TIG1 VH и VL в соответствующие выбранные человеческие каркасные последовательности.

Аминокислотная последовательность сконструированной гуманизованной TIG1 VH (HuTIG1 VH) представляет собой

MDSRLNLVFLVLIILKGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFGMHWVRQAPGKGL
EWFVAFISSGSSSIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCARMRLDYAMDY
WGQGMVTVSS (SEQ ID NO: 34).

Аминокислотная последовательность зрелой HuTIG1 VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFGMHWVRQAPGKGLEWVAFISSGSSSIY
YADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCARMRLDYAMDYWGQGMVTVSS
(SEQ ID NO: 35)

начинается в положении 20 в SEQ ID NO: 34.

Аминокислотная последовательность сконструированной гуманизированной TIG1 VL (HuTIG1 VL) представляет собой

```
MRFQVQVLGLLLLWISGAQCIDIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASKSISKYLAWYQQKPGKAP
KLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHNEYPWTFGGGTKVEIK
(SEQ ID NO:36).
```

Аминокислотная последовательность зрелой HuTIG1 VL

```
DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASKSISKYLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHNEYPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:37),
```

начинается в положении 21 в SEQ ID NO: 36.

Ген, кодирующий HuTIG1 VH, синтезировали в виде экзона, включающего сигнал донора сплайсинга на 3' конце кодирующей области, SpeI сайт на 5' конце фрагмента и HindIII сайт на 3' конце фрагмента. Нуклеотидная последовательность синтетического HuTIG1 VH гена, фланкированная SpeI и HindIII сайтами (SEQ ID NO: 38), показана вместе с предсказанной аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 34) на фиг. 9A.

Ген, кодирующий HuTIG1 VL, синтезировали в виде экзона, включающего сигнал донора сплайсинга на 3' конце кодирующей области, NheI сайт на 5' конце фрагмента и EcoRI сайт на 3' конце фрагмента. Нуклеотидная последовательность синтетического HuTIG1 VL гена, фланкированная NheI и EcoRI сайтами (SEQ ID NO: 39), показана вместе с предсказанной аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 36) на фиг. 9B.

Вектор экспрессии млекопитающего рHuTIG1.AA (фиг. 10) для продукции гуманизированной IgG1/каппа формы мышиного моноклонального античеловеческого антитела к TIGIT, TIG1 (HuTIG1-IgG1.AA) был сконструирован как содержащий следующие генетические компоненты. По направлению часовой стрелки от SalI сайта на фиг. 10 вектор содержит транскрипционную единицу тяжелой цепи, начиная с главного предраннего промотора и энхансера из цитомегаловируса человека (CMV) (CMV-P на фиг.) для инициации транскрипции гена тяжелой цепи антитела. После CMV промотора следует экзон, кодирующий вариабельную область тяжелой цепи гуманизированной формы TIG1, фланкированный SpeI и HindIII сайтами (HuTIG1 VH), геномная последовательность, содержащая человеческие константные области $\gamma 1$ тяжелой цепи, включая экзоны CH1, шарнирной области, CH2 и CH3 с промежуточными интронами, и сайт полиаденилирования человеческого гена тяжелой $\gamma 1$ цепи. CH2 область, кодируемая в рHuTIG1.AA, содержит замены аминокислот на аланиновые остатки в положениях 234 и 235 (Eu нумерация) (L234A/L235A) для элиминации эффекторных функций (Hezareh et al., J. Virol. 75:12161-12168, 2001). После последовательности гена тяжелой цепи транскрипционная единица легкой цепи начинается с CMV промотора и энхансера (CMV-P), с последующим экзоном, кодирующим вариабельную область легкой цепи гуманизированной формы TIG1, фланкированным NheI и EcoRI сайтами (HuTIG1 VL), геномной последовательностью, содержащей человеческий экзон константной области каппа цепи (Ск) с предшествующей ему частью интрона, и сайтом полиаденилирования человеческого гена каппа цепи после Ск экзона. Затем после гена легкой цепи следует ранний промотор SV40 (SV40-P), ген пурамицин N-ацетил-трансферазы (puго) для резистентности к пурамицину, и сегмент, содержащий сайт полиаденилирования SV40 (SV40-A). И наконец, рHuTIG1.AA содержит часть плазмиды рUC19, включающую бактериальную точку начала репликации (рUC ori) и ген β лактамазы (β лактамаза). Стрелки на фиг. показывают ориентацию транскрипции.

Аминокислотная последовательность зрелой тяжелой гамма цепи HuTIG1-IgG1.AA, кодируемой в рHuTIG1.AA, представляет собой

```
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFGMHVWRQAPGKGLEWVAFISSGSSSIYYADTV
KGRFTISRDNAKNSLYLQMSLRAEDTAVYYCARMRLDYAMDYWGQGTMTVSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHNTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS
SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
K (SEQ ID NO:40).
```

С-концевой лизин может присутствовать или не присутствовать.

Аминокислотная последовательность зрелой легкой каппа цепи HuTIG1-IgG1.AA, кодируемой в рHuTIG1.AA, представляет собой

```
DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASKSISKYLAWYQQKPGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHNEYPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
TASVVCCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTLSKADYEKHKVY
ACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:41).
```

Вектор экспрессии рHuTIG1.AA вводили в хромосомы в клеточной линии CHO-K1 яичников ки-

тайского хомячка (ATCC, Manassas, VA) для получения клеточных линий, стабильно продуцирующих HuTIG1-IgG1.AA. CHO-K1 клетки выращивали в SFM4CHO среде (GE Healthcare Life Sciences, Logan, UT) при 37°C в 7,5% CO₂ инкубаторе. Стабильную трансфекцию в CHO-K1 осуществляли путем электропорации. Перед трансфекцией рHuTIG1.AA линеализировали с использованием FspI. В типичном эксперименте примерно 10⁷ клеток трансфицировали при помощи 20 мкг линеализированной плазмиды, суспендировали в SFM4CHO среде и высевали при 100 мкл/лунка в несколько 96-луночных планшетов после соответствующих разведений клеток. Через 48 ч добавляли SFM4CHO среду, содержащую 20 мкг/мл пурамицина, при 100 мкл/лунка для выделения стабильных трансфектантов. Примерно через десять дней после начала селекции культуральные супернатанты трансфектантов анализировали на продукцию антител.

Экспрессию HuTIG1-IgG1.AA измеряли сэндвич-методом ELISA. В типичном эксперименте ELISA планшет покрывали козлиным анти-человеком IgG Fc-специфическим поликлональным антителом, промывали промывочным буфером (PBS, содержащий 0,05% Tween 20) и блокировали ELISA буфером (PBS, содержащий 2% снятого молока и 0,05% Tween 20). После промывки промывочным буфером испытываемые образцы, соответствующим образом разведенные в ELISA буфере, наносили на ELISA планшет. Соответствующее гуманизированное IgG1/к антитело использовали в качестве стандарта. После инкубации ELISA планшета в течение 1 ч при комнатной температуре и промывки промывочным буфером, связанные антитела определяли с использованием HRP-конъюгированного козлиного поликлонального антитела к каппа цепи человека. После инкубации планшета в течение 0,5 ч при комнатной температуре и промывки промывочным буфером инициировали проявление цвета путем добавления 100 мкл/лунка ABTS субстрата (Sigma-Aldrich) и останавливали при помощи 100 мкл/лунка 2% щавелевой кислоты. Поглощение считывали при 405 нм. CHO-K1 стабильные трансфектанты, продуцирующие высокие уровни HuTIG1-IgG1.AA, увеличивали в объеме в SFM4CHO до тех пор, пока клеточная жизнеспособность не становилась меньше чем 50%. После центрифугирования и фильтрации культуральные супернатанты загружали на колонку с Белком А (HiTrap MABSelect SuRe, GE Healthcare, Piscataway, NJ). Колонку промывали при помощи PBS, затем антитело элюировали с использованием 0,1 М глицин-HCl (pH 3,0). Буфер элюируемых антител нейтрализовали при помощи 1 М Tris-HCl (pH 8) и затем обменивали с PBS путем диализа. Концентрацию антител определяли путем измерения поглощения при 280 нм (1 мг/мл=1,4 OD).

Пример 5. Характеристика HuTIG1-IgG1.AA

Связывание HuTIG1-IgG1.AA с человеческим TIGIT исследовали методом ELISA. ELISA планшет покрывали 5 мкг/мл hTIGIT-Fc в PBS (100 мкл/лунка) при 4°C в течение ночи, промывали промывочным буфером (PBS, содержащий 0,05% Tween 20) и блокировали при помощи 200 мкл/лунка SuperBlock блокирующего буфера (Thermo Fisher Scientific). После промывки лунок промывочным буфером добавляли HuTIG1-IgG1.AA, начиная с 2,5 мкг/мл и серийных 2-кратных разведений в SuperBlock блокирующем буфере, для связывания со связанным на планшете человеческим TIGIT. После инкубации ELISA планшета в течение 1 часа при комнатной температуре и промывки промывочным буфером связанные антитела определяли с использованием 100 мкл/лунка HRP-конъюгированного козлиного поликлонального антитела против человеческой каппа цепи (Southern Biotech), 1/2000-разбавленного в ELISA Буфере. После инкубации в течение 30 минут при комнатной температуре и промывки промывочным буфером инициировали проявление цвета с использованием 100 мкл/лунка ABTS субстрата и останавливали при помощи 100 мкл/лунка 2% щавелевой кислоты. Поглощение считывали при 405 нм. Как показано на фиг. 11, HuTIG1-IgG1.AA связывались с человеческий TIGIT дозо-зависимым образом. Полумаксимальная эффективная концентрация (EC₅₀) HuTIG1-IgG1.AA для связывания с TIGIT составила 65 нг/мл. Это показывает, что HuTIG1-IgG1.AA представляет собой хорошее связующее для человеческого TIGIT.

Связывание HuTIG1-IgG1.AA с человеческим TIGIT также исследовали методом проточной цитометрии. NS0-hTIGIT клетки (8×10⁵ клеток) инкубировали в 160 мкл FACS Буфера (PBS, содержащий 0,5% бычьего сывороточного альбумина и 0,05% азида натрия) в присутствии (или в отсутствие) различных концентраций HuTIG1-IgG1.AA, начиная с 10 мкг/мл и серийных 2-кратных разведений, в течение 20 мин при 4°C. После промывки FACS Буфером связывание HuTIG1-IgG1.AA на NS0-hTIGIT клетках определяли с использованием PE-меченного козлиного античеловеческого IgG антитела в FACS буфере. После инкубации в течение 20 минут и промывки FACS Буфером клетки подвергали проточной цитометрии с использованием FACScan проточного цитометра (BD Biosciences, San Jose, CA) для получения среднечанальной флуоресценции (MCF) при каждой концентрации антител. Фиг. 12 показывает график MCF (вертикальная ось) при каждой концентрации антител (горизонтальная ось). EC₅₀ значение составляло 60 нг/мл. Это показывает, что HuTIG1-IgG1.AA представляет собой хорошее связующее для человеческого TIGIT, экспрессируемого на клеточной поверхности.

Активность HuTIG1-IgG1.AA для блокирования взаимодействия между человеческим TIGIT и человеческим CD155 анализировали методом проточной цитометрии с использованием NS0-hTIGIT клеток. NS0-hTIGIT клетки (10⁶ клеток) инкубировали с суб-насыщающей концентрацией (125 нг/мл) FITC-меченных hCD155-Fc слитых белкой (hCD155-Fc-FITC) в 200 мкл FACS Буфера в присутствии (или в отсутствие) различных концентраций HuTIG1-IgG1.AA, начиная с 10 мкг/мл и серийных 2-кратных раз-

ведений, в течение 20 мин при 4°C. После промывки FACS Буфером NS0-hTIGIT клетки подвергали проточной цитометрии с использованием FACScan проточного цитометра (BD Biosciences, San Jose, CA). Для исследования связывания hCD155-Fc-FITC на клетках получали MCF при каждой концентрации антител. Как показано на фиг. 13, HuTIG1-IgG1.АА блокировали взаимодействия между hCD155-Fc-FITC и TIGIT на клеточной поверхности дозозависимым образом. Полумаксимальная ингибирующая концентрация (IC₅₀) HuTIG1-IgG1.АА для блокирования TIGIT-CD155 взаимодействия составляла 67 нг/мл. Это показывает, что HuTIG1-IgG1.АА является эффективным блокатором взаимодействия между CD155 и TIGIT.

Пример 6. Конструирование и экспрессия гуманизированного TIG3 антитела

Гуманизацию VH и VL TIG3 осуществляли, следуя общей процедуре, описанной в примере 4. Аминокислотная последовательность сконструированной гуманизированной VH TIG3 (HuTIG3 VH) представляет собой

MNFGRLRLIFLVLTLKGVNCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSDYDMSWVRQAPGKGL
EWWAYISDGGYNTYYPDTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQIILLRYYFDYW
QGTTVTVSS (SEQ ID NO: 42).

Аминокислотная последовательность зрелой VH HuTIG3

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSDYDMSWVRQAPGKGLVWVAYISDGGYNTYYPDTV
KGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQIILLRYYFDYWGQTTVTVSS (SEQ ID NO: 43)

начинается в положении 20 в SEQ ID NO: 42.

Аминокислотная последовательность сконструированной гуманизированной VL TIG3 (HuTIG3 VL) представляет собой

MDSQAQVLMMLLLWVSGTCGDIQMTQSPSSLSASVGRVITITCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQ
KPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQYHSPWTFGGGT
KVEIK (SEQ ID NO: 44).

Аминокислотная последовательность зрелой VL HuTIG3

DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRESGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQYHSPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID
NO: 45),

начинается в положении 21 в SEQ ID NO: 44.

Ген, кодирующий HuTIG3 VH, синтезировали в виде экзона, включающего сигнал донора сплайсинга на 3' конце кодирующей области, SpeI сайт на 5' конце фрагмента и HindIII сайт на 3' конце фрагмента. Нуклеотидная последовательность синтетического гена HuTIG3 VH (SEQ ID NO: 46) показана вместе с предсказанной аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 42) на фиг. 14А.

Ген, кодирующий гуманизированную VL TIG3 (HuTIG3 VL), синтезировали в виде экзона, включающего сигнал донора сплайсинга на 3' конце кодирующей области, NheI сайт на 5' конце фрагмента и EcoRI сайт на 3' конце фрагмента. Нуклеотидная последовательность синтетического HuTIG3 VL гена (SEQ ID NO: 47) показана вместе с предсказанной аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 44) на фиг. 14В.

Вектор экспрессии млекопитающего рHuTIG3.АА для продукции гуманизированной IgG1/каппа формы моноклонального антитела TIG3 против человеческого TIGIT (HuTIG3-IgG1.АА) конструировали путем модификации рHuTIG1.АА следующим образом: (1) HuTIG1 VH ген заменяли HuTIG3 VH геном между SpeI и HindIII сайтами, и (2) HuTIG1 VL ген заменяли HuTIG3 VL геном между NheI и EcoRI сайтами. СH2 область, кодируемая в рHuTIG3.АА, содержит замены аминокислот на аланиновые остатки в положениях 234 и 235 (Eu нумерация) (L234А/L235А) для элиминирования эффекторных функций.

Аминокислотная последовательность зрелой тяжелой гамма цепи HuTIG3-IgG1.АА, кодируемой в рHuTIG3.АА, представляет собой

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSDYDMSWVRQAPGKGLVWVAYISDGGYNTYYPDTV
KGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQIILLRYYFDYWGQTTVTVSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS
SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K (SEQ ID NO: 48)

С-концевой лизин может присутствовать или не присутствовать.

Аминокислотная последовательность зрелой легкой каппа цепи HuTIG3-IgG1.АА, кодируемой в рHuTIG3.АА, представляет собой

DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRESGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQYHSPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 49).

Транзиентную трансфекцию рHuTIG3.АА в 100 мл экспоненциально растущих Ехр1293 клеток

(Thermo Fisher Scientific) осуществляли в соответствии с протоколом поставщика. CHO-K1 стабильные трансфектанты, продуцирующие высокие уровни HuTIG3-IgG1.АА, также получали путем электропорапии рHuTIG3.АА, как описано выше, и увеличивали в объеме в SFM4CHO до тех пор, пока клеточная жизнеспособность не становилась меньше чем 50%. HuTIG3-IgG1.АА очищали из культуральных супернатантов каждые транзитивно трансфицированных Expi293 клеток и стабильно трансфицированных CHO-K1 клеток на аффинной колонке с белком А, как описано выше.

Пример 7. Характеристика HuTIG3-IgG1.АА

Связывание HuTIG3-IgG1.АА с человеческим TIGIT исследовали методом ELISA, как описано в примере 5. Как показано на фиг. 15, HuTIG3-IgG1.АА связывается с человеческим TIGIT дозозависимым образом. Полумаксимальная эффективная концентрация (EC_{50}) HuTIG3-IgG1.АА для связывания с TIGIT составила 85 нг/мл. Это показывает, что HuTIG3-IgG1.АА представляет собой хорошее связывающее для человеческого TIGIT.

Связывание HuTIG3-IgG1.АА с человеческим TIGIT также исследовали методом проточной цитометрии, как описано в примере 5. Как показано на фиг. 12, HuTIG3-IgG1.АА связывается с человеческим TIGIT дозозависимым образом. Полумаксимальная эффективная концентрация (EC_{50}) HuTIG3-IgG1.АА для связывания с TIGIT составила 370 нг/мл. Это показывает, что HuTIG3-IgG1.АА представляет собой хорошее связывающее для человеческого TIGIT.

Активность HuTIG3-IgG1.АА для блокирования взаимодействия TIGIT с CD155 анализировали методом проточной цитометрии с использованием NS0-hTIGIT клеток и FITC-меченного hCD155-Fc, как описано в примере 5. Как показано на фиг. 13, HuTIG3-IgG1.АА блокирует взаимодействие между TIGIT и CD155 дозозависимым образом. Полумаксимальная ингибирующая концентрация (IC_{50}) HuTIG3-IgG1.АА для блокирования TIGIT-CD155 взаимодействия составляла 279 нг/мл. Это показывает, что HuTIG3-IgG1.АА является эффективным блокатором взаимодействия между CD155 и TIGIT.

Пример 8. Ответ IL-2 цитокинов на столбнячный анатоксин в человеческих Т-клетках усиливается посредством блокады TIGIT

Способность мышинных анти-TIGIT антител усиливать антигенспецифические Т-клеточные ответы исследовали с использованием *in vitro* анализа антигенспецифического ответа на столбнячный анатоксин (см., например, Piersma et al., *Vaccine*. 2006 Apr 12;24(16):3076-83; Zaunders et al., *J Immunol*. 2009 Aug 15;183(4):2827-36). Достаточная вакцинальная защита для столбнячного анатоксина достигается при помощи бустер-инъекций, которые позволяют иммунной системе индуцировать ответы CD4+ и CD8+ Т-клеток памяти. В качестве суррогатного показателя эффективности (см., например, Plotkin et al., *Clin Vaccine Immunol*. 2010 Jul; 17(7):1055-1065; Goulon et al. *Nov. 1972 Presse Med*. 1:3049-3050.), уровни в сыворотке 0,1 МЕ/мл анатоксина против столбняка указывают на поддержание иммунного ответа.

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMCs) от людей-добровольцев, вакцинированных столбнячным анатоксином, получали (iQ Biosciences) с подтверждением титра столбняка в крови добровольцев выше чем 1,0 МЕ/мл методом ELISA (Genway). 800000 PBMCs культивировали в RPMI 1640 среде (Invitrogen), содержащей 10% фетальную бычью сыворотку (FBS), в 96-луночных круглодонных планшетах (Nunc). 2 мкг/мл столбнячного анатоксина (List Biological Laboratories) добавляли в лунки, содержащие PBMCs, в присутствии мышинового анти-PD-1 антитела (Biolegend, клон EH12.2H7) или анти-TIGIT антитела (TIG1) при 3,3 или 10 мкг/мл в течение 4 дней при 37°C в 5% CO₂ инкубаторе. В качестве контроля 2 мкг/мл столбнячного анатоксина добавляли к PBMC без каких-либо антител. Супернатанты из культивированных лунок собирали и измеряли содержание цитокинов, указывающих на Т-клеточную активацию, IL-2, путем мультиплексного анализа на микросферах (BD Pharmingen, CBA Th1/Th2 Cytokine Kit) методом проточной цитометрии (BD FACSCalibur). Как показано на фиг. 16, продукция IL-2 при стимуляции только столбнячным анатоксином составила 31 пг/мл. Продукция IL-2 еще больше повышалась до 70 и 86 пг/мл в присутствии мышинового анти-TIGIT антитела TIG1 при 3,3 мкг/мл и 10 мкг/мл соответственно. Продукция IL-2 при стимуляции столбнячным анатоксином также повышалась до 39 пг/мл и 57 пг/мл в присутствии мышинового анти-PD-1 антитела EH12.2H7 при 3,3 и 10 мкг/мл соответственно. Эти данные показывают, что TIG1 обладает функциональной способностью усиливать антигенспецифические ответы Т-клеточных цитокинов.

Пример 9. Пролиферативный ответ Т-клеток человека на столбнячный анатоксин усиливается посредством блокады TIGIT

Способность мышинных анти-TIGIT антител усиливать антигенспецифические Т-клеточные ответы исследовали с использованием *in vitro* анализа антигенспецифического ответа на столбнячный анатоксин (см., например, Piersma et al., *Vaccine*. 2006 Apr 12;24(16):3076-83; Zaunders et al., *J Immunol*. 2009 Aug 15;183(4):2827-36). PBMC от людей-добровольцев, вакцинированных столбнячным анатоксином, получали (iQ Biosciences) как описано в примере 8. PBMC метили карбоксифлуоресцеинсукцинимидиловым эфиром (CFSE) (ThermoFisher), представляющим собой реагент, используемый для *in vitro* и *in vivo* мечения клеток для отслеживания нескольких поколений и использованием разведения красителя методом проточной цитометрии. 250000 CFSE-меченные PBMCs культивировали в AIM-V среде (Invitrogen) в 96-луночных круглодонных планшетах (Nunc). 2 мкг/мл столбнячного анатоксина (Astarte Biologies, LLC) добавляли в каждую лунку в присутствии мышинового анти-PD-1 антитела (Biolegend клон EH12.2H7) или

TIG1 при 2,5, 5 или 10 мкг/мл в каждой лунке. Клетки инкубировали в течение 4 дней при 37°C в 5% CO₂ инкубаторе. В День 4 IL-2 [50 единиц/мл] (Peprotech) добавляли к культурам, а в День 6 PBMCs собирали для измерений пролиферации методом проточной цитометрии (BD FACSCalibur) для определения разбавления CFSE на CD4+ Т-клетках или CD8+ Т-клетках.

Как показано на фиг. 17 (верхние панели), столбнячный анатоксин индуцировал пролиферацию 4,5 и 6,5% человеческих CD4+ Т-клеток, полученных от доноров 1 и 2 соответственно. Добавление TIG1 еще больше повышало CD4+ Т-клеточную пролиферацию при всех испытываемых концентрациях антител (2,5, 5 и 10 мкг/мл), при этом подобные пролиферативные эффекты наблюдали с анти-PD-1 антителом при этих диапазонах доз.

Как показано на фиг. 17 (нижние панели), столбнячный анатоксин индуцировал пролиферацию 15 и 15,5% человеческих CD8+ Т-клеток, полученных от доноров 1 и 2 соответственно. Добавление TIG1 еще больше повышало CD8+ Т-клеточную пролиферацию при всех испытываемых концентрациях антител (2,5, 5 и 10 мкг/мл), при этом подобные пролиферативные эффекты наблюдали с анти-PD-1 антителом EN12.2H7 при этих диапазонах доз. Эти результаты показывают, что TIG1 обладает способностью усиливать антигенспецифические Т-клеточные пролиферативные ответы.

Пример 10. Повышение NK-клеточно-опосредованной цитотоксичности с использованием человеческих первичных эффекторных клеток и K562 клеток-мишеней посредством блокады TIGIT

Человеческие NK-клетки способны индуцировать природную цитотоксичность для клеток-мишеней, которые не содержат MHC I, таких как K562, клеточная линия хронического миелогенного лейкоза (CML) (см., например, Nagel et al., *Cancer Res* 1981;41:2284-2288; Andersson et al., *Int J Cancer*. 1979 Feb;23(2):143-7.; Lozzio et al., *Leuk Res*. 1979;3(6):363-70). Экспрессию CD155 (PVR) на K562 клетках (ATCC) подтверждали с использованием коммерческого антитела (Biolegend анти-CD155 клон SKII.4). Как показано на фиг. 18 (верхняя панель), 98% K562 клеток, как было обнаружено, экспрессируют высокие уровни CD155 (черная гистограмма). Экспрессию TIGIT на человеческих CD56-положительных NK-клетках в PBMC (iQ Biosciences) с использованием коммерческого антитела (eBiosciences анти-TIGIT клон MBSA43 и Biolegend анти-CD56 клон HCD56) также подтверждали на 3 репрезентативных человеческих донорах (фиг. 18, нижние панели).

Лизис K562 клеток, опосредованный NK-клетками, измеряли с и без TIG1. PBMC культивировали в течение ночи в AIM-V среде (Invitrogen) в присутствии интерлейкина-2 (IL-2) [200 единиц/мл] (Peprotech) при 37°C в 5% CO₂ инкубаторе. На следующий день K562 клетки метили CFSE и совместно культивировали 1:100 с PBMCs (Мишень:PBMCs; одна K562 клетка на сто PBMC, которые содержали примерно 5% NK-клеток) в течение 4 ч при 37°C в 5% CO₂ инкубаторе в присутствии 10 мкг/мл TIG1. После инкубации клетки собирали и окрашивали при помощи 5 нМ Sytox Red (ThermoFisher) для различения мертвых клеток-мишеней при помощи (CFSE+ Sytox Red+). Проценты K562 клеток-мишеней, лизированных NK-клетками, определяли методом проточной цитометрии (FACSCalibur; FlowJo Анализ). Как показано на фиг. 19, 2% K562 клеток было лизировано без TIG1. Когда добавляли TIG1, было лизировано 4,4% K562 клеток. Добавление TIG1 повышало NK-клеточно-опосредованную природную цитотоксичность K562 клеток двукратно, демонстрируя, что TIG1 обладает способностью повышать уровень киллинга клеток-мишеней субпопуляцией человеческих эффекторных клеток.

Пример 11. SEB-индуцированная продукция цитокинов человеческими Т-клетками усиливается посредством блокады TIGIT

Суперантигены, такие как SEB (*Staphylococcus Enterotoxin B*), активируют Т-клетки путем связывания молекул MHC класса II на антигенпрезентирующих клетках с $\nu\beta$ элементом TCR, приводя к продукции цитокинов, включая интерлейкин-2 (IL-2), интерлейкин-6 (IL-6), фактор некроза опухоли альфа (TNF α) и интерферон гамма (IFN γ) (см., например, Krakauer et al., *Toxins (Basel)*. 2010 Aug; 2(8):1963-1983). По сравнению с типичным антигениндуцированным Т-клеточным ответом, где 0,1-0,001% Т-клеток могут активироваться, SEB способен активировать до 10-20% Т-клеток в человеческой крови в зависимости от фракции Т-клеток, содержащих $\nu\beta 3$, $\nu\beta 12$, $\nu\beta 14$ и $\nu\beta 17$, обнаруженной в крови каждого конкретного донора. Поэтому SEB можно использовать для Т-клеточного анализа секреции цитокинов для определения уровня модуляции мишени посредством блокады TIGIT с использованием клеток цельной крови человека (WBC).

Свежевыделенные образцы WBC (Stanford Blood Center) получали с использованием натрий гепарина не позднее чем через 4 ч после взятия крови с отсутствием визуальных признаков гемолиза. 250 мкл распределяли аликвотами по лункам в 96-луночные круглодонные планшеты (Nunc) и стимулировали при помощи SEB (Toxin Technology) при 1 мкг/мл конечной концентрации в присутствии 10 мкг/мл гуманизированного анти-PD-1 моноклонального антитела или 10 мкг/мл HuTIG1-IgG1.АА в течение 24 часов при 37°C в 5% CO₂ инкубаторе. Через 24 ч 96-луночные планшеты быстро центрифугировали для отделения слоя плазмы для сбора. После сбора образцов плазмы уровни экспрессии IL-2, IL-6, TNF α и IFN γ измеряли путем мультиплексного анализа на микросферах для определения содержания цитокинов (Biolegend, LEGENDplex™ Панель человеческих CD8/NK) методом проточной цитометрии (BD FACSCalibur) и анализировали с использованием Biolegend программы для количественного определения.

Для определения изменения уровня экспрессии каждого из IL-2, IL-6, TNF α и IFN γ , уровень цитокинов в присутствии испытываемого антитела (плюс SEB) делили на уровень цитокинов в отсутствие антитела для каждого донора. 2-кратное изменение (например, определенное в присутствии анти-TIGIT), таким образом, означает, что абсолютная концентрация цитокинов, измеренная в эксперименте, в два раза больше обнаруженной в SEB-стимулированных контрольных условиях. Как показано на фиг. 20, SEB-стимулированная продукция IL-2, IL-6, TNF α или IFN γ клетками крови здорового донора повышалась в присутствии 10 мкг/мл гуманизированного анти-PD-1 или 10 мкг/мл HuTIG1-IgG1.AA. В этих условиях, SEB-индуцированная продукция цитокинов клетками WBC и ее модуляция при помощи HuTIG1-IgG1.AA является регистрируемым показателем потенцирования эффекторных ответов цитокинов. HuTIG1-IgG1.AA способен потенцировать иммунные ответы, как продемонстрировано стимуляцией продукции IL-2, IL-6, TNF α и IFN γ в показанном анализе.

Пример 12. Характеристика HuTIG1-IgG1.AA и HuTIG3-IgG1.AA-опосредованной комплемент-зависимой цитотоксичности

Комплементзависимая цитотоксичность (CDC) относится к лизису клетки, которая экспрессирует молекулы-мишени в присутствии комплемента (см., например, Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods*, 202:163). Активация классического пути комплемента инициируется связыванием первого компонента системы комплемента (C1q) с антителами (подходящего подкласса), которые связаны с их распознанным антигеном на клеточной поверхности. Для оценки активации комплемента, человеческую T-клеточную двойную репортерную родительскую клеточную линию Jurkat (Dual Jurkat; Invivogen) сконструировали для стабильной экспрессии человеческого TIGIT (Jurkat-TIGIT) на поверхности. Как показано на фиг. 21, экспрессию TIGIT на поверхности Jurkat-TIGIT клеток подтверждали методом проточной цитометрии с использованием коммерческого PE-меченного анти-TIGIT антитела (eBiosciences клон MSBA43). Jurkat-TIGIT поэтому использовали в качестве клеток-мишеней, которые конститутивно экспрессируют мембрана-связанный TIGIT и, таким образом, могут подвергаться активности антитело-связанного CDC в присутствии комплемента.

Анализ CDC осуществляли с использованием Jurkat-TIGIT клеток и человеческого комплемента в присутствии HuTIG1-IgG1.AA, HuTIG3-IgG1.AA или кроличьего антигемоцититарного глобулина (ATG) (Fresenius Biotech GmbH) с увеличивающимися концентрациями до 50 мкг/мл. ATG использовали в качестве положительного контроля из-за его реактивности с Jurkat клетками и документально подтвержденной комплементзависимой цитотоксической активности с Jurkat клетками (см., например, Eiermann et al., *J Hematother Stem Cell Res.* 2001 Jun; 10 (3):385-90.; Ayuk et al., *AntiCancer Research* 29: 1355-1360 (2009). 50000 Jurkat-TIGIT клеток в RPMI 1640 среде (Invitrogen), содержащей 10% фетальную бычью сыворотку (FBS), высевали в 96-луночные круглодонные планшеты (Nunc). Используемые для обработки антитела добавляли, начиная с наивысшей концентрации 50 мкг/мл, с последующим трехкратным серийным разведением, и оставляли для инкубации с клетками в течение 1 ч при 37°C в 5% CO₂ инкубаторе. После этой 1-часовой инкубации добавляли человеческий комплемент и оставляли для инкубации еще в течение 3 ч при 37°C в 5% CO₂ инкубаторе. После завершения этой 3-часовой инкубации добавляли 5 мкг/мл пропидий иодида (ThermoFisher) и образцы анализировали методом проточной цитометрии (BD FAC-SCalibur) для определения процентов пропидий иодид-положительных в качестве показателя клеточной гибели.

Для определения нормализованных изменений проценты жизнеспособных клеток измеряли методом проточной цитометрии и процент пропидий иодид-положительных клеток оценивали как мертвые клетки. Значения для необработанных образцов нормализовали к 100%. Проценты жизнеспособности образцов в присутствии антитела делили на нормализованные необработанные с получением кратного изменения жизнеспособности. Как показано на фиг. 22, ни HuTIG1-IgG1.AA ни HuTIG3-IgG1.AA вплоть до 50 мкг/мл не индуцировали CDC активность. Эти данные показывают, что связывание как HuTIG1-IgG1.AA, так и HuTIG3-IgG1.AA с TIGIT не приводит к комплемент-опосредованной клеточной гибели T-клеток.

Пример 13. Характеристика HuTIG1-IgG1.AA и HuTIG3-IgG1.AA с использованием Jurkat двойной репортерной клеточной линии

Функциональное следствие блокирования человеческого TIGIT рецептора анализировали с использованием Jurkat-TIGIT репортерной клеточной линии, которая несет в хромосоме секретированный люциферазный репортерный ген, который управляется IFN β минимальным промотором, слитым с пятью копиями NF-кВ консенсусного элемента транскрипционного ответа и тремя копиями c-Rel сайта связывания. Jurkat-TIGIT клетки также экспрессируют секретированный эмбриональный репортерный ген щелочной фосфатазы (SEAP) под контролем ISG54 минимального промотора вместе с пятью элементами IFN-стимулируемого ответа.

Анализы включают две клеточные линии, представляющие T-эффекторные клетки (Jurkat-TIGIT) и антигенпрезентирующие клетки. T-эффекторные клетки стабильно экспрессируют люциферазный репортер, который активируется ниже от T-клеточного рецептора (TCR). Антигенпрезентирующие клетки (искусственные антигенпрезентирующие клетки или "aAPC") стабильно экспрессируют активаторный белок

T-клеток, который связывается и активирует T-эффекторную клетку, такую как Jurkat-TIGIT, антиген-независимым образом (Promega). aAPC клетки также сконструированы для экспрессии CD155. Когда T-эффекторную клетку совместно культивируют с ее соответствующей aAPC клеткой, взаимодействие TIGIT с CD155 ингибирует активацию T-эффекторных клеток и уменьшает экспрессию люциферазы. Добавление анти-TIGIT блокирующего антитела высвобождает ингибиторный сигнал, делающий возможной экспрессию люциферазной активности.

В этом анализе 16000 aAPC, которые экспрессируют человеческий CD155 и активаторный белок T-клеток (TCR Активатор CD155 CHO-K1) (Promega) высевали на 96-луночный планшет с половинным объемом лунок и инкубировали при 37°C в 5% CO₂ инкубаторе в течение 24 ч. На следующий день 50000 человеческих Jurkat-TIGIT клеток совместно культивировали с TCR Активатор CD155 CHO-K1 в отсутствие или в присутствии HuTIG1-IgG1.AA или HuTIG3-IgG1.AA, начиная при 10 мкг/мл с двукратным серийным разведением, еще в течение 24 ч. Супернатанты собирали и секретируемую люциферазу измеряли с использованием QUANTI-Luc (Invivogen) и многорежимного планшет-ридера (Perkin Elmer En-Spire) в виде относительных световых единиц. Для определения кратного изменения относительных световых единиц относительные световые единицы Jurkat-TIGIT, совместно культивированных с TCR Активатор CD155 CHO-K1 в присутствии различных концентраций анти-TIGIT антител, делили на относительные световые единицы в отсутствие антител. Поэтому в качестве примера 2-кратное увеличение (например, определенное в присутствии анти-TIGIT), таким образом, означает, что относительные световые единицы, измеренные в эксперименте, в два раза больше, чем количество, определенное в контрольных условиях, стимулированных только TCR-активатором.

Как показано на фиг. 23, и HuTIG1-IgG1.AA и HuTIG3-IgG1.AA могли повышать естественную T-клеточную активирующую сигнализацию, как определено по увеличению относительных световых единиц, индуцированных в присутствии каждого блокирующего TIGIT антитела, от 0,6 мкг/мл до 10 мкг/мл, примерно с 1,5-2,5-кратным увеличением. Эти данные показывают, что анти-TIGIT антитела обладают антагонистической активностью, блокируя функцию TIGIT, и повышают естественную T-клеточную активность.

Пример 14. Конкурентное связывание с TIGIT

Проточную цитометрию используют для идентификации антитела, которое конкурирует с TIG1 за связывание с человеческим TIGIT. TIG1 метят флуоресцентным красителем FITC с использованием набора для FITC-мечения антител Pierce (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с протоколом изготовителя. Связывание полученного FITC-меченного TIG1 с человеческим TIGIT исследуют методом проточной цитометрии с использованием NS0-hTIGIT клеток. Сто тысяч NS0-hTIGIT клеток инкубируют с различными концентрациями FITC-меченного TIG1, начиная с 10 мкг/мл и двукратных серийных разведений, в 200 мкл FACS Буфера (PBS, содержащий 0,5% бычьего сывороточного альбумина и 0,05% азида натрия) при 4°C в течение 30 мин. После промывки при помощи 2 мл FACS Буфера NS0-hTIGIT клетки суспендируют в 0,2 мл FACS Буфера и подвергают анализу методом проточной цитометрии с использованием проточного цитометра FACScan (BD Biosciences, San Jose, CA) и получают среднеканальную флуоресценцию (MCF) при каждой концентрации антител. Субнасыщающую концентрацию, где достигается 90% от максимального уровня флуоресценции, определяют для FITC-меченного TIG1.

Субнасыщающую концентрацию FITC-меченного TIG1 инкубируют со ста тысячами NS0-hTIGIT клеток в присутствии (или в отсутствие) 200-кратно более высокой концентрации испытываемого антитела в 200 мкл FACS Буфера при 4°C в течение 30 мин. Например, когда 0,1 мкг/мл FITC-меченного TIG1 используют для связывания с NS0-hTIGIT клетками, 20 мкг/мл испытываемого антитела добавляют к клеточной суспензии. В качестве фонового контроля сто тысяч NS0-hTIGIT клеток инкубируют без каких-либо антител. После промывки при помощи 2 мл FACS Буфера NS0-hTIGIT клетки суспендируют в 0,2 мл FACS Буфера и подвергают анализу методом проточной цитометрии.

MCF значение для клеток NS0-hTIGIT, инкубированных с FITC-меченным TIG1 [MCF A], нормализуют к 100%, и MCF значение для клеток NS0-hTIGIT, инкубированных без каких-либо антител [MCF B], нормализуют к 0%. MCF значение для клеток NS0-hTIGIT, инкубированных с FITC-меченным TIG1 и испытываемым антителом [MCF C], нормализуют с использованием следующей формулы: $100 \times ([MCF C] - [MCF B]) / ([MCF A] - [MCF B])$. Когда нормализованное значение MCF для NS0-hTIGIT, инкубированных с FITC-меченным TIG1 и испытываемым антителом, меньше чем 20%, испытываемое антитело определяется как конкурирующее с TIG1 за связывание с человеческим TIGIT.

Такой же анализ можно использовать для идентификации антител, которые конкурируют с TIG2 или TIG3.

Пример 15. Измерение аффинности

Антигенсвязывающую аффинность моноклональных антител можно измерить при помощи безмаркерных оптических биосенсоров на эффекте поверхностного плазмонного резонанса (SPR), таких как Biacore T100 (GE Healthcare Life Sciences, Marlborough, MA), ProteOn XPR36 (BioRad, Hercules, CA), Octet RED384 (ForteBio, Menlo Park, CA) и IBIS MX96 (Wasatch Microfluidics, Salt Lake City, UT) (Yang et al., Anal. Biochem. 508:78-96, 2016). Аффинность связывания антигена для каждого из TIG1, TIG2 и TIG3 измеряли с использованием Biacore T100, как описано Yang et al. (supra). Белок A/G (Thermo Fisher Scien-

tific) иммобилизовали на проточных ячейках в CM5 сенсорном чипе (GE Healthcare Life Sciences) с использованием стандартного протокола связывания. Испытываемое антитело (TIG1, TIG2 или TIG3) захватывалось белком A/G на CM5 сенсорном чипе. Различные концентрации рекомбинантных человеческих TIGIT белков, таких как Рекомбинантный Человеческий TIGIT, His-меченный (Creative BioMart, Shirley, NY), использовали в потоке для связывания с испытываемым антителом на сенсорном чипе. Значения скорости ассоциации (k_a) и скорости диссоциации (k_d) взаимодействия между испытываемым антителом и человеческим TIGIT получали с использованием программы BIAevaluation (GE Healthcare Life Sciences). Константу ассоциации (K_a) рассчитывали путем деления скорости ассоциации (k_a) на скорость диссоциации (k_d) для каждого из TIG1, TIG2 и TIG3. Константу диссоциации (K_d) рассчитывали путем деления скорости диссоциации (k_d) на скорость ассоциации (k_a).

Исследования с использованием биосенсоров для HuTIG1-IgG1.АА осуществляли на BioRad ProteOn XPR36 системе в 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,4, 0,005% Tween-20 и 0,2 мг/мл BSA при 25°C. HuTIG1-IgG1.АА разбавляли до 3,7, 1,2 и 0,4 нМ и захватывали в течение 5 мин на GLM сенсорном чипе, покрытом ~10000 RU античеловеческого IgG антитела от GE. His-меченный растворимый рекомбинантный человеческий TIGIT (Cat # TIT-H52H3; Acro Biosystems, Newark, DE) испытывали при 100 нМ в виде наивысшей концентрации в 3-кратных серийных разведениях до 1,2 нМ. Данные от трех разных поверхностных плотностей антител глобально подгоняли к 1:1 модели взаимодействия с использованием локально установленного R_{max} . Полученные скорость ассоциации (k_a) и скорость диссоциации (k_d) представляли собой $(4,42 \pm 0,02) \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ и $(4,09 \pm 0,02) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ соответственно. Рассчитанная константа диссоциации (K_d) имела значение $925 \pm 7 \text{ пМ}$.

Пример 16. Картирование эпитопов

Для локализации эпитопа, распознаваемого каждым из TIG1, TIG2 и TIG3 в TIGIT молекуле, мутанты с одной аминокислотной заменой были образованы во внеклеточной области TIGIT (SEQ ID NO: 3) методом сайт-направленного мутагенеза с использованием ПЦП с перекрывающимися расширениями (Higuchi, R., 1989, в "PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification", Erlich H. A., ed., Stockton Press, New York, NY, pp 61-70). Для анализа использовали следующие шесть мутантов во внеклеточной области TIGIT: Q35A (SEQ ID NO: 50), N37A (SEQ ID NO: 51), Q39A (SEQ ID NO: 52), N49A (SEQ ID NO: 53), D51A (SEQ ID NO: 54) и F86A (SEQ ID NO: 55). Буква слева, цифра в середине и буква справа в названии каждого мутанта означают аминокислотный остаток в TIGIT дикого типа, расположение считая от N-концевого метионинового остатка во внеклеточной области TIGIT (SEQ ID NO: 3), и аминокислоту в мутанте, соответственно. Аминокислотные остатки обозначены однобуквенным кодом. Каждый из этих шести мутантов содержит аминокислотную замену вблизи области контакта TIGIT-CD155 комплекса (Stengel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 109:5399-5404, 2012).

Вектор экспрессии млекопитающего pFCm179 имел такую же структуру, как pFCm404 (фиг. 1), за исключением того, что (i) ген пурамицин N-ацетилтрансферазы заменен геном ксантингуанинфосфорибозилтрансферазы *E. coli*, и (ii) внеклеточная область человеческого TIGIT заменена человеческим IL-15. ДНК фрагменты, кодирующие шесть включающих замену аланином мутантов внеклеточной области человеческого TIGIT, индивидуально встраивали в pFCm179 для замены IL-15-кодирующей области. Полученные векторы экспрессии, pFCm179-Q35A, pFCm179-N37A, pFCm179-Q39A, pFCm179-N49A, pFCm179-D51A и pFCm179-F86A, содержали Q35A, N37A, Q39A, N49A, D51A и F86A мутанты в TIGIT-кодирующей области, соответственно, и экспрессировали такую же последовательность TIGIT-Fc слитых белков, как кодируемая в pFCm4 04, за исключением одной аминокислотной замены, специфической для каждого мутанта.

Дикого типа и мутантные TIGIT-Fc слитые белки транзистентно экспрессировали в клеточной линии эмбриональных почек человека HEK293. HEK293 клетки выращивали в DMEM, содержащей 10% FCS, при 37°C в 7,5% CO₂ инкубаторе. Векторы экспрессии дикого типа и мутантных TIGIT-Fc слитых белков (pFCm404, pFCm179-Q35A, pFCm179-N37A, pFCm179-Q39A, pFCm179-N49A, pFCm179-D51A и pFCm179-F86A) индивидуально трансфицировали в HEK293 клетки способом с использованием полиэтиленимина (Durocher et al. Nucl. Acids Res. 30: e9, 2002). Уровни продукции TIGIT-Fc слитых белков в культуральных супернатантах измеряли методом ELISA. Вкратце, ELISA планшет покрывали 100 мкл/лунка козлиным анти-человеком IgG Fc-специфическим поликлональным антителом (Sigma-Aldrich), 1/2000-разведенным в PBS, при 4°C в течение ночи, промывали промывочным буфером и блокировали ELISA Буфером 200 мкл/лунка в течение 20 мин при комнатной температуре. После промывки промывочным буфером культуральные супернатанты транзистентно трансфицированных HEK293 клеток, соответствующим образом разведенные в ELISA Буфере (100 мкл/лунка), наносили на ELISA планшет. Очищенный hTIGIT-Fc использовали в качестве стандарта. После инкубации ELISA планшета в течение 30 мин при комнатной температуре и промывки промывочным буфером определяли связанные Fc слитые белки с использованием 100 мкл/лунка HRP-конъюгированного козлиного анти-человеком IgG поликлонального антитела (SouthernBiotech), 12000-разведенного в ELISA Буфере. После инкубации планшета в течение 30 минут при комнатной температуре и промывки промывочным буфером инициировали проявление цвета путем добавления 100 мкл/лунка ABTS субстрата (Sigma-Aldrich) и останавливали при

помощи 100 мкл/лунка 2% щавелевой кислоты. Поглощение считывали при 405 нм.

Связывание каждого из мышинных TIG1, TIG2 и TIG3 антител с TIGIT мутантами исследовали методом ELISA. ELISA планшет покрывали при помощи 100 мкл/лунка козлиным античеловеческим IgG Fc-специфическим поликлональным антителом (Sigma-Aldrich), 1/2000 разведенным в PBS, при 4°C в течение ночи, промывали промывочным буфером и блокировали 200 мкл/лунка ELISA Буфером в течение 20 мин при комнатной температуре. После промывки промывочным буфером 0,5 мкг/мл транзитивно экспрессируемых TIGIT-Fc слитых белков, содержащих либо TIGIT дикого типа, либо один из шести TIGIT мутантов, в ELISA Буфере (100 мкл/лунка) наносили на ELISA планшет в двух параллельных экспериментах для инкубации при комнатной температуре в течение 30 мин. В качестве отрицательного контроля использовали культуральные супернатанты нетрансфицированных HEK293 клеток. После промывки промывочным буфером наносили 100 мкл/лунка 200 нг/мл испытываемого антитела (TIG1, TIG2 или TIG3) в ELISA Буфере (100 мкл/лунка). После инкубации ELISA планшета в течение 30 минут при комнатной температуре и промывки промывочным буфером определяли связанные антитела с использованием 100 мкл/лунка HRP-конъюгированного козляного поликлонального антитела к мышиной каппа цепи (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX), 1/2000 разбавленного в ELISA Буфере. После инкубации планшета в течение 0,5 ч при комнатной температуре и промывки промывочным буфером инициировали проявление цвета путем добавления 100 мкл/лунка ABTS субстрата (Sigma-Aldrich) и останавливали при помощи 100 мкл/лунка 2% щавелевой кислоты. Поглощение считывали при 405 нм.

Таблица 1. Связывание TIG1, TIG2 и TIG3 с TIGIT мутантами

TIGIT мутант	Относительное связывание с TIGIT (%)		
	TIG1	TIG2	TIG3
Q35A (SEQ ID NO: 50)	-0.1	29.1	57.8
N37A (SEQ ID NO:51)	0.8	75.1	83.5
E39A (SEQ ID NO:52)	71.1	69.1	94.2
N49A (SEQ ID NO:53)	0.5	42.6	37.2
D51A (SEQ ID NO:54)	1.8	61.0	41.1
F86A (SEQ ID NO:55)	49.5	40.5	43.2

Для каждого из TIG1, TIG2 и TIG3 относительное связывание с каждым TIGIT мутантом рассчитывали по следующей формуле. Среднее поглощение с дикого типа TIGIT-Fc слитыми белками [Abs A] нормализовали к 100%, и среднее поглощение с культуральными супернатантами нетрансфицированных HEK293 клеток [Abs B] нормализовали к 0%. Среднее поглощение с мутантным TIGIT-Fc слитым белком [Abs C] нормализовали с использованием следующей формулы: $100 \times ([Abs C] - [Abs B]) / ([Abs A] - [Abs B])$. Результат представлен в табл. 1. Относительное связывание TIG1 было меньше чем 5%, когда аминокислотный остаток был заменен аланином в положении 35, 37, 49 или 51, указывая на то, что аминокислотные остатки в этих четырех положениях являются критичными для связывания TIG1 с TIGIT. Ни один из TIGIT мутантов, используемых в этом анализе, не устранил связывание TIG2 и TIG3 с TIGIT.

Пример 17. Повышенная секреция IFN γ при добавлении HuTIG1-IgG1.AA, анти-PD-L1 антитела и HuTIG1-IgG1.AA в комбинации с анти-PD-L1 антителом

Человеческие PBMCs сначала выделяли из лейкоцитарной пленки путем наслаивания крови на градиентную среду (Lymphoprep; STEMCELL; 07801) и сбора PBMCs после центрифугирования из интерфазы. На следующей стадии человеческие моноциты выделяли из PBMCs путем CD14 положительной селекции (набор EasySep для положительной селекции человеческих CD14; STEMCELL; Cat# 18058) в соответствии с протоколом изготовителя и культивировали в течение шести дней в RPMI среде, дополненной 5% FBS и 0,1 мкг/мл GM-CSF (R&D; Cat# 215-GM-050/CF) и 0,1 мкг/мл IL-4 (R&D; Cat# 204-IL-050/CF). Дифференцированные моноцитарные дендритные клетки (moDCs) собирали и проверяли на экспрессию CD155, CD112 и PD-L1 методом проточной цитометрии (фиг. 24).

Человеческие CD4+ клетки от 4 разных доноров выделяли из лейкоцитарных пленок путем отрицательного истощения (RosetteSep коктейль, обогащенный человеческими CD4 T-клетками; STEMCELL; #15062) и определяли чистоту методом проточной цитометрии.

moDCs и CD4+ клетки объединяли в соотношении 1:4 (25000 moDCs; 100000 CD4+ клеток) и культивировали в течение четырех дней в бессывороточной среде (X-Vivo-20; LONZA; Cat# 04-448Q) в присутствии HuTIG1-IgG1.AA (5 мкг/мл или 15 мкг/мл) или анти-PD-L1 антитела (10 мкг/мл; клон 243,55.S1; SEQ ID NO: 56 & 57) или обоих HuTIG1-IgG1.AA (15 мкг/мл) и анти-PD-L1 антитела (10 мкг/мл) в течение 4 дней перед количественным анализом IFN γ с использованием Цитометрического Анализа на Микросферах (CBA; Human IFN γ Flex Set; BD; Cat# 560111). Человеческий IgG1 Fc (25 мкг/мл; BioXcell; Cat# BE0096) использовали в качестве контроля.

Как показано на фиг. 25, блокада HuTIG1-IgG1.AA и анти-PD-L1 антителом независимо повышала продукцию IFN γ по сравнению с соответствующим изотипическим контрольным антителом. Комбинация HuTIG1-IgG1.AA с анти-PD-L1 антителом существенно и синергически повышала продукцию IFN γ по сравнению с любой монотерапией, используемой отдельно.

Пример 18. HuTIG1-IgG1.AA и HuTIG3-IgG1.AA распознают TIGIT, экспрессируемый на человеческих лимфоидных и миелоидных клетках

Суммарные человеческие PBMCs, выделенные у десяти доноров, совместно окрашивали непосред-

ственно конъюгированными антителами, разграничивая Т-клетки, В-клетки, НК-клетки и субпопуляции миелоидной линии. Мертвые клетки исключали с использованием набора для окрашивания Live/dead Fixable Aqua Dead Cell Stain kit. Экспрессию TIGIT определяли с использованием HuTIG1-IgG1.АА и HuTIG3-IgG1.АА антител, конъюгированных с Alexa47 красителем. Экспрессию CD96 определяли с использованием коммерчески доступного анти-CD96 антитела (клон NK92,39). На фиг. 26А, знак плюс (+) означает экспрессию выше фоновой, а (+++) означает наивысшую наблюдаемую экспрессию. Знак плюс/минус (+/-) показывает, что только субпопуляция клеток в обозначенной популяции экспрессирует TIGIT или CD96 выше фонового значения, а знак минус (-) указывает на отсутствие экспрессии выше фоновой. Во всех случаях фоновое значение определяли с использованием модифицированного способа Fluorescence Minus One (FMO), в котором были добавлены все флуорохромы, используемые в окрашивающей панели, за исключением целевого антитела (т.е. HuTIG1-IgG1.АА, HuTIG3-IgG1.АА, анти-CD96 антитело). Наоборот, целевое антитело заменяли IgG специфическим изотипическим контрольным антителом такой же конфигурации. Фиг. 26В показывает репрезентативные гистограммы окрашивания анти-TIGIT антителами в PBMCs при разных уровнях экспрессии, которые использовали для определения уровней экспрессии CD96 на фиг. 26А. Светлые гистограммы представляют модифицированный FMO. Темные гистограммы представляют HuTIG1-IgG1.АА или HuTIG3-IgG1.АА окрашивание.

Диссоциированные опухолевые клетки из меланомы, колоректального злокачественного новообразования, немелкоклеточной карциномы легкого и светлоклеточной почечно-клеточной карциномы получали из коммерческого источника и окрашивали непосредственно конъюгированными антителами, разграничивая Т-клетки и антигенпрезентирующие клеточные субпопуляции. Лейкоциты идентифицировали с использованием пан-изоформы анти-CD45 антитела (клон HI30). Мертвые клетки исключали с использованием набора для окрашивания Live/dead Fixable Aqua Dead Cell Stain kit. Экспрессию TIGIT определяли с использованием HuTIG1-IgG1.АА антитела, конъюгированного с Alexa47 красителем. Во всех случаях фоновое значение определяли с использованием модифицированного способа Fluorescence Minus One (FMO), в котором были добавлены все флуорохромы, используемые в окрашивающей панели, за исключением целевого антитела (т.е. HuTIG1-IgG1.АА). Наоборот, целевое антитело заменяли IgG специфическим изотипическим контрольным антителом такой же конфигурации. Фиг. 32В показывает репрезентативные гистограммы анти-TIGIT окрашивания на опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах (TILs) при разных уровнях экспрессии, показанных на фиг. 32А. Светлые гистограммы представляют модифицированный FMO. Темные гистограммы представляют HuTIG1-IgG1.АА окрашивание.

Пример 19. Картирование эпитопов античеловеческого TIGIT антитела HuTIG1-IgG1.АА методом проточной цитометрии

Человеческую кДНК TIGIT клонировали в pcDNA 3.1 (+) с включающей 9 остатков гемагглютининовой (НА) пептидной меткой, с последующим состоящим из 10 остатков пептидным линкером, встроенным после состоящего из 21 остатка природного сигнального пептида и перед N-концом зрелого TIGIT белка (SEQ ID NO: 58). Аминокислотные остатки, представляющие интерес (T34, Q35, N37, E39, L44, I47, N49, D51, L52, H55, F86, I88, H90, Y92 и T96), во внеклеточной области человеческого TIGIT были мутированы в аланин, по одной аминокислоте за один раз. Плазмиды очищали и транзигентно трансфицировали в CHO-K1 клетки с использованием реагента Fugene 6 (Promega) для трансфекции в соответствии с рекомендациями изготовителя. Экспрессию НА-меченного человеческого TIGIT мутанта подтверждали путем детекции при помощи анти-НА антитела.

Для анализа проточной цитометрии связывания анти-hTIGIT антитела с эпитопом, НА-меченные человеческие TIGIT белки с или без одиночной аминокислотной мутации транзигентно трансфицировали в CHO-K1 клетки. Через 24 часа трансфицированные клетки суспендировали в HBSS буфере (Thermo Fisher Scientific, Cat# 14175095) и инкубировали с HuTIG1-IgG1.АА антителом при меняющихся концентрациях в объеме 50 мкл. После инкубации в течение 1 часа при 4°C клетки промывали и осуществляли вторую инкубацию с 50 мкл Alexa488-конъюгированного античеловеческого IgG(H+L) вторичного антитела (Thermo Fisher Scientific, Cat#A-11013) для детекции клеток, связанных антителом. Клетки инкубировали с анти-НА антителом (Sigma, Cat# N7411) в качестве положительного контроля, а нетрансфицированные CHO-K1 клетки использовали в качестве отрицательного контроля. Клетки анализировали на Attune NxT цитометре (Thermo Fisher Scientific) и данные обрабатывали с использованием программы FlowJo. Для каждого мутанта MFI (средняя интенсивность флуоресценции) при связывании насыщающего антитела нормализовали к 100% ПОС (процент от контроля), и MFI для контроля с отсутствием связывания первичного антитела нормализовали к 0% ПОС. Данные затем использовали для получения нелинейной сигмоидальной кривой с 4 параметрами при помощи программы для подборки кривой GraphPad Prism 7 с использованием следующей формулы: $Y = \text{Нижняя точка} + (\text{Верхняя точка} - \text{Нижняя точка}) / (1 + 10^{-(\text{LogEC}_{50-x}) * \text{угловой коэффициент Хилла}})$.

В этом анализе HuTIG1-IgG1.АА связывался с человеческим TIGIT дикого типа с $EC_{50} = 1,28$ нМ. Пять из пятнадцати одноточечных аланиновых TIGIT мутантов связывались с HuTIG1-IgG1.АА с более чем 10-кратным снижением аффинности связывания. Человеческий TIGIT (SEQ ID NO: 3) с мутациями N49A, D51A, H90A, N37A или Q35A связывался с HuTIG1-IgG1.АА с активностью, уменьшающейся в следующем диапазоне $EC_{50} = 17,7$ до 176 нМ, соответственно (фиг. 27). Все из этих остатков ко-

локализуются к одной дискретной области на передней β -листовой структуре IgV внеклеточного домена TIGIT (фиг. 28).

Пример 20. *Ex vivo* Иммунофенотипирование Т-клеточных субпопуляций из цельной крови различных от человека приматов, которым вводили HuTIG1-IgG1.AA

Фармакокинетическое исследование осуществляли в Charles River Laboratories (Reno, NV). Целью этого исследования было исследование *ex vivo* образцов цельной крови от обезьян *cynomolgus*, которым вводили одну дозу 10 мг/кг анти-TIGIT (HuTIG1-IgG1.AA) антитела для опосредованной оценки занятости рецепторов для TIGIT.

Трем ранее не подверженным экспериментам самкам обезьян *cynomolgus* (#67, #68 & #69) вводили разовую внутривенную дозу 10 мг/кг HuTIG1-IgG1.AA антитела. Образцы цельной крови в натрий гепарине получали в течение 24 ч после последнего сбора образцов в точках времени, которые соответствовали следующим: пред-дозовая, Дни 1, 2, 7, 14, 21 и 28 после введения дозы. Для исследования цельной крови методом проточной цитометрии флуоресцентно меченное анти-человеческое TIGIT от BioLegend (клон MBSA43) использовали для определения уровней экспрессии TIGIT на клеточных субпопуляциях лимфоцитов крови обезьян *cynomolgus*, поскольку, как было показано, они перекрестно реагируют с нечеловеческими приматами (PLoS Pathog. 2016 Jan; 12(1); BioLegend). Живые клетки получали при помощи FACSCalibur и анализировали с использованием программы FlowJo.

Анти-TIGIT (MBSA43) было способно связываться как с CD4+, так и с CD8+ Т-клеточными субпопуляциями при окрашивании пред-дозовых образцов цельной крови. После введения дозы анти-TIGIT (MBSA43) было неспособно обнаруживать экспрессию TIGIT на этих Т-клеточных субпопуляциях вплоть до Дня 14 или 21, в зависимости от разных исследуемых обезьян, при этом уровни возвращались к пред-дозовым уровням обнаружения к Дню 21 или 28, в зависимости от разных исследуемых животных (фиг. 29B & 30B). Причиной этой неспособности обнаруживать экспрессию TIGIT не были существенные изменения частоты CD4+ или CD8+ Т-клеток (фиг. 29A & 30A соответственно), из чего можно заключить, что это было из-за занятости поверхности TIGIT обрабатываемым антителом (HuTIG1-IgG1.AA), а не из-за истощения Т-клеточной субпопуляции.

Эти данные подтверждают, что анти-TIGIT антитело HuTIG1-IgG1.AA является перекрестно-реактивным у обезьян *cynomolgus*, и использование античеловеческого TIGIT от BioLegend (клон MBSA43) обеспечивает оценку занятости TIGIT рецептора.

Пример 21. Повышенная NK-клеточноопосредованная цитотоксичность, вызванная HuTIG1-IgG1.AA и HuTIG3-IgG1.AA на K562 клетках-мишенях

Анализ NK-клеточноопосредованной цитотоксичности, описанный в Примере 10, повторяли с использованием очищенных NK клеток вместо PBMCs. Для получения достаточных и подходящих очищенных NK клеток для этих экспериментов важно осуществить скрининг на донорные PBMCs с высокой NK-клеточной частотой, достаточной экспрессией TIGIT на поверхности и достаточной экспрессией CD226. Получали LeukoPak периферической крови (состоящие из 10 миллиардов клеток или больше) и осуществляли выделение NK клеток с использованием Miltenyi autoMACS Pro Separator в соответствии с инструкциями изготовителя (Miltenyi Biotec, catalog#130-092-657). Очищенные NK клетки ресуспендировали в среде, содержащей интерлейкин-2 (IL-2) [200 единиц/мл], в 6-луночных планшетах. 6-луночные планшеты помещали в 5% CO₂ инкубатор при 37°C на 24 ч перед осуществлением исследования естественной цитотоксичности с клетками, собранными из лунок.

Лизис K562 клеток, опосредованный очищенными NK клетками, измеряли с и без анти-TIGIT антитела (TIG1). NK клетки культивировали в RPMI 1640 среде (Invitrogen) в присутствии интерлейкина-2 (IL-2) [200 единиц/мл] (Peprotech) в течение ночи при 37°C в 5% CO₂ инкубаторе. На следующий день K562 клетки метили CFSE и совместно культивировали 1:20 с NK клетками (Мишень:NK; одна K562 клетка на двадцать NK клеток) в течение 4 ч при 37°C в 5% CO₂ инкубаторе в присутствии 10 мкг/мл Ритуксана или гуманизированных анти-TIGIT антител (HuTIG1-IgG1.AA или HuTIG3-IgG1.AA). Ритуксан использовали в качестве отрицательного контроля, поскольку K562 клетки не экспрессируют CD20. После инкубации клетки собирали и окрашивали при помощи 5 нМ Sytox Красного (ThermoFisher) для различения мертвых клеток-мишеней при помощи (CFSE+ Sytox Красный+). Проценты K562 клеток-мишеней, лизированных NK-клетками, определяли методом проточной цитометрии (FACSCalibur; Анализ FlowJo).

Как показано на фиг. 31, при использовании очищенных NK клеток добавление анти-TIGIT антител повышало NK-клеточно-опосредованную природную цитотоксичность K562 клеток, демонстрируя, что анти-TIGIT антитела (HuTIG1-IgG1.AA или HuTIG3-IgG1.AA) обладают способностью повышать уровень киллинга клеток-мишеней (на 28 или 19%, соответственно, по сравнению с нормализованными процентами "Без Антитела" или с Ритуксаном) субпопуляцией человеческих эффекторных клеток.

Последовательности

SEQ ID NO:1: Аминокислотная последовательность зрелого человеческого TIGIT:

MMTGTIETTGNISAEKGGSIILQCHLSSTTAQVTQVNWEQQDQLLAICNADLGWHISPS
FKDRVAPGPGGLGLTLQSLTVNDTGEYFCIYHTYPDGTYTGRIFLEVLESSVAEHGARFQIPLLG
AMAATLVVICTAVIVVVALTRKKKALRIHSEVGDRLRRKSAGQEWSAPSAPPPGSCVQAEAAPA
GLCGEQRGEDCAELHDYFNVLSYRSLGNCSEFFTETG

SEQ ID NO:2: Аминокислотная последовательность сигнального пептида выше внеклеточной области человеческого TIGIT:
MGWSWIFFFLSGTASVLS

SEQ ID NO:3: Аминокислотная последовательность внеклеточной области человеческого TIGIT (hTIGIT):
MMTGTIETTGNISAEKGGSIILQCHLSSTTAQVTQVNWEQQDQLLAICNADLGWHISPSFKDRV
APGPGGLGLTLQSLTVNDTGEYFCIYHTYPDGTYTGRIFLEVLESSVAEHGARFQIPTG

SEQ ID NO:4: Аминокислотная последовательность полипептидного линкера непосредственно ниже от hTIGIT: TGGG

SEQ ID NO:5: Аминокислотная последовательность человеческой $\gamma 1$ Fc области:

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:6: Аминокислотная последовательность внеклеточной области человеческого CD155:

DVVVQAPTQVPGFLGDSVTLPCYLQVPNMEVTHVSQLTWARHGEGSGMAVFHQQTGPSY
SESKRLEFVAARLGAELRNASLRMFLRVEDEGNYTCLFVTFPQGSRSVDIWLRLVAKPQNTAE
VQKVQLTGEPVPMARCVSTGGRPPAQITWHSDLGMPNTSQVPGFLSGTIVTSLWILVPSQV
DGKNVTCKVEHESFEKPQLLTVNLTVYYPPEVSI SGYDNNWYLGQNEATLTCDARSNPEPTGYN
WSTTMGPLPPFAVAQGAQLLIRPVDKPIINTTLICNVTNALGARQAELTVQVKEGPPSEHSGMSR
NA

SEQ ID NO:7: Аминокислотная последовательность внеклеточной области человеческого CD155, слитой с Fc областью человеческой $\gamma 1$ цепи (hCD155-Fc):

DVVVQAPTQVPGFLGDSVTLPCYLQVPNMEVTHVSQLTWARHGEGSGMAVFHQQTGPSY
SESKRLEFVAARLGAELRNASLRMFLRVEDEGNYTCLFVTFPQGSRSVDIWLRLVAKPQNTAE
VQKVQLTGEPVPMARCVSTGGRPPAQITWHSDLGMPNTSQVPGFLSGTIVTSLWILVPSQV
DGKNVTCKVEHESFEKPQLLTVNLTVYYPPEVSI SGYDNNWYLGQNEATLTCDARSNPEPTGYN
WSTTMGPLPPFAVAQGAQLLIRPVDKPIINTTLICNVTNALGARQAELTVQVKEGPPSEHSGMSR
NATGGGEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:8: Аминокислотная последовательность FLAG пептида

041301

(FLAG): DYKDDDDK

SEQ ID NO:9: Аминокислотная последовательность сигнала связывания гликозилфосфатидилинозита человеческого CD55 (GPI):
PNKGSQTTSGTRLLSGHTCFTLTGLLGLVTMGLLT

SEQ ID NO:10: Аминокислотная последовательность TIG1 VH:
DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSNFGMHWVRQAPEKGLEWVAFISSGSSSIYADTV
KGRFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDTAMYYCARMRLDYAMDYWGQGTSVTVSS

SEQ ID NO:11: Аминокислотная последовательность TIG1 VH
CDR1: NFGMH

SEQ ID NO:12: Аминокислотная последовательность TIG1 VH
CDR2: FISSGSSSIYADTVKG

SEQ ID NO:13: Аминокислотная последовательность TIG1 VH
CDR3: MRLDYAMDY

SEQ ID NO:14: Аминокислотная последовательность TIG1 VL:
DVQITQSPSYLAASPGETITINCRASKSISKYLAWYQEKPGKTNKLLIYSGSTLQSGIPSRFSG
SGSGTDFTLTISSLEPEDFAMYYCQHNEYPWTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO:15: Аминокислотная последовательность TIG1 VL
CDR1: RASKISKYLA

SEQ ID NO:16: Аминокислотная последовательность TIG1 VL
CDR2: SGSTLQS

SEQ ID NO:17: Аминокислотная последовательность TIG1 VL
CDR3: QQHNEYPWT

SEQ ID NO:18: Аминокислотная последовательность TIG2 VH:
EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEYTMHWVKQSHGKNLEWIGGINPNNGGTSYNQKF
KGRATLTVDKSSSTAYMELRSLTSDDSAVYYCARPGWYNYAMDYWGQGTSVTVSS

SEQ ID NO:19: Аминокислотная последовательность TIG2 VH
CDR1: EYTMH

SEQ ID NO:20: Аминокислотная последовательность TIG2 VH
CDR2: GINPNNGGTSYNQKFKG

SEQ ID NO:21: Аминокислотная последовательность TIG2 VH
CDR3: PGWYNYAMDY

SEQ ID NO:22: Аминокислотная последовательность TIG2 VL:
DIVMTQSHKFMSTSVGDRVNITCKASQGVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYTGVDPDRFTG
SGSGTDFTFITISSVQAEDLAVYHCQQHYITPWTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO:23: Аминокислотная последовательность TIG2 VL
CDR1: KASQGVSTAVA

041301

SEQ ID NO:24: Аминокислотная последовательность TIG2 VL
 CDR2: SASRYRT

SEQ ID NO:25: Аминокислотная последовательность TIG2 VL
 CDR3: QQHYITPWT

SEQ ID NO:26: Аминокислотная последовательность TIG3 VH:
 EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAPSDYDMSWVRQTPKRLWVAYISDGGYNTYYPDTV
 KGRFTISRDNKNTLYLQMSLKSIEDTAIYYCARQILLRYYFDYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO:27: Аминокислотная последовательность TIG3 VH
 CDR1: DYDMS

SEQ ID NO:28: Аминокислотная последовательность TIG3 VH
 CDR2: YISDGGYNTYYPDTVKG

SEQ ID NO:29: Аминокислотная последовательность TIG3 VH
 CDR3: QILLRYYFDY

SEQ ID NO:30: Аминокислотная последовательность TIG3 VL:
 DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMTCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGV
 PDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYCQQYHNSYPWTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO:31: Аминокислотная последовательность TIG3 VL
 CDR1: KSSQSLLYSSNQKNYLA

SEQ ID NO:32: Аминокислотная последовательность TIG3 VL
 CDR2: WASTRES

SEQ ID NO:33: Аминокислотная последовательность TIG3 VL
 CDR3: QQYHNSYPWT

SEQ ID NO:34: Аминокислотная последовательность
 сконструированной гуманизированной TIG1 VH (HuTIG1 VH):
 MDSRLNLVFLVLLKGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFGMHWRQAPGKGL
 EWFVAFISSGSSSIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMSLRAEDTAVYYCARMRLDYAMDYW
 GQGTMTVTVSS

SEQ ID NO:35: Аминокислотная последовательность зрелой
 HuTIG1 VH:
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFGMHWRQAPGKGLWVAFISSGSSSIY
 YADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMSLRAEDTAVYYCARMRLDYAMDYWGQGTMTVTVSS

SEQ ID NO:36: Аминокислотная последовательность
 сконструированной гуманизированной TIG1 VL (HuTIG1 VL):
 MRFQVQVLGLLLLWISGAQCDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASKSISKYLAWYQQKPKGKAP
 KLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHNEYPWTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO:37: Аминокислотная последовательность зрелой

HuTIG1 VL:

DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCRASKSISKYLAWYQQKPKGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQHNEYPWTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO:38: Нуклеотидная последовательность синтетического HuTIG1 VH гена в pHuTIG1.AA:

ACTAGTACCACCATGGACTCCAGGCTCAATCTGGTTTTCCCTTGTCTTATTCTGAAAGGCGTCCAGTGTGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTGCAGCCTGGAGGTCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAACTTTGGAATGCACTGGGTTGCACAGCTCCAGGGAAAGGGCTGGATGGGTGGCATTATTAGTAGTGGCAGTAGTTCCTACTATGCAGACACAGTGAAGGGCCGATTCCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAATGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACTGCCGTGATTACTGTGCAAGAATGAGACTGGATTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCATGGTCACCGTCTCCTCAGGTAAGTATGGCCTCTAAGCTT

SEQ ID NO:39: Нуклеотидная последовательность синтетического HuTIG1 VL гена в pHuTIG1.AA:

CTAGCACCACCATGAGTTCCAGGTTCCAGTTCTGGGGCTCCTTCTGCTCTGGATCTCAGGAGCCAGTGTGATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCTCTTCTGTCATCTGTTGGAGATAGACTCACTATTACTTGCAGGGCAAGTAAGAGCATTAGCAAAATATCTGGCCTGGTATCAACAGAACCTGGAAAGCTCCTAAGCTGCTTATCTACTCTGGGTCCACTTTGCAACTGGAGTCCATCAAGATTTCAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGATTTCACTCTCACCATCAGTAGCCTGCAGCCTGAAATTTTGAACCTATTACTGTCAACAGCATAATGAATACCCCTGGACCTTCGGCGGAGGCACCAAAGTCGAAATCAAACGTAAGTAGAATCCAAAGAATTC

SEQ ID NO:40: Аминокислотная последовательность зрелой гамма тяжелой цепи HuTIG1-IgG1.AA, кодируемой в pHuTIG1.AA: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFGMHWVRQAPGKGLEWVAFISSGSSSIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARMRLDYAMDYWGQGMVTVSSASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

SEQ ID NO:41: Аминокислотная последовательность зрелой капла легкой цепи HuTIG1-IgG1.AA, кодируемой в pHuTIG1.AA: DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCRASKSISKYLAWYQQKPKGKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQHNEYPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG

TASVCLLNIFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVY
ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:42: Аминокислотная последовательность
сконструированной гуманизированной TIG3 VH (HuTIG3 VH):
MNFGLRLIFLVLTLKGVNCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFQFSDYDMSWVRQAPGKGL
EHWVAYISDGGYNTYYPDTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCARQILLRYYFDYW
GQGTITVTVSS

SEQ ID NO:43: Аминокислотная последовательность зрелой
HuTIG3 VH:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFQFSDYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISDGGYNTY
YPDTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCARQILLRYYFDYWGQGTITVTVSS

SEQ ID NO:44: Аминокислотная последовательность
сконструированной гуманизированной TIG3 VL (HuTIG3 VL):
MDSQAQVLMLLLLLWVSGTCDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQ
KPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQYHSPWTFGGGT
KVEIK

SEQ ID NO:45: Аминокислотная последовательность зрелой
HuTIG3 VL:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGKAPKLLIYWAST
RESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQYHSPWTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO:46: Нуклеотидная последовательность
синтетического HuTIG3 VH гена в рHuTIG3.AA:

ACTAGTACCACCATGAACCTTGGGCTCAGATTGATTTTCCTTGCTTACTCTGAAAGG
CGTGAAGTGTGAAGTCCAGCTCGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTTGTGCAGCCTGGAGGTCCTCG
AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCGCTTTCAGTACTATGACATGCTTGGGTTCGCCAGG
CTCCTGGCAAGGGCTGGAGTGGTTCGCATACATTAGTATGGCGGTTATAACACCTACTATCC
AGACACTGTGAAGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAAGTCCCTGTACCTGCAA
ATGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGCTATTTACTGTGCAAGACAATTTCTGCTGCGGT
ACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTGTACAGTCTCCTCAGGTGAGTCTTAAACA
AGCTT

SEQ ID NO:47: Нуклеотидная последовательность
синтетического HuTIG3 VL гена в рHuTIG3.AA:

GCTAGCACCACCATGGATTCACAGGCCAGGTTCTTATGCTGCTGCTGCTGGGTTTC
TGGAACCTGTGGGGACATTAGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGTGCTCAGTTGGAGAC
AGGGTTACTATCACCTGCAAGTCCAGTCCAGTCTTCTGTATAGTAGCAATCAAAAGAAGTACT
TGGCCTGGTACCAGCAAACAGGGAAGGCTCCTAAACTGCTGATTTACTGGGCATCCACTAG

GGAATCTGGGGTCCCTAGTCGCTTCTCAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATC
 AGCAGTCTGCAGCCTGAAGACTTCGCAGTTTATTACTGTGAGCAATATCATAGCTATCCCTGGA
 CCTTCGGCGGAGGCACCAAGGTGGAATCAAACGTAAGTAGAATCCAAAGAATTC

SEQ ID NO:48: Аминокислотная последовательность зрелой
 гамма тяжелой цепи HuTIG3-IgG1.АА, кодируемоq в pHuTIG3.АА:
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFQFSDYDMSWVRQAPGKLEWVAYISDGGYNTYYPDTV
 KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQILLRYYFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVF
 PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
 SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
 RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
 YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
 SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPG
 K

SEQ ID NO:49: Аминокислотная последовательность зрелой
 каппа легкой цепи HuTIG3-IgG1.АА, кодируемоq в pHuTIG3.АА:
 DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKSSQSLYSSNQKNYLAWYQQKPKAPKLLIYWASTRESGV
 PSRFGSGSGSTDFLTISSLQPEDFAVYYCQQYHSYPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD
 EQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADY
 EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:50: Аминокислотные последовательности
 внеклеточной области человеческого TIGIT с Q35A мутацией:

MMTGTIETTGNI SAEKGGSIILQCHLSSTTAQVTAVNWEQQDQLLAICNADLGWHISPS
 FKDRVAPGPGGLTLQSLTVNDTGEYFCIYHTYPDGTYTGRI FLEVLESSVAEHGARFQIPTG

SEQ ID NO:51: Аминокислотные последовательности
 внеклеточной области человеческого TIGIT с N37A мутацией:

MMTGTIETTGNI SAEKGGSIILQCHLSSTTAQVTQVAWEQQDQLLAICNADLGWHISPS
 FKDRVAPGPGGLTLQSLTVNDTGEYFCIYHTYPDGTYTGRI FLEVLESSVAEHGARFQIPTG

SEQ ID NO:52: Аминокислотные последовательности
 внеклеточной области человеческого TIGIT с Q39A мутацией:

MMTGTIETTGNI SAEKGGSIILQCHLSSTTAQVTQVNWAQQDQLLAICNADLGWHISPS
 FKDRVAPGPGGLTLQSLTVNDTGEYFCIYHTYPDGTYTGRI FLEVLESSVAEHGARFQIPTG

SEQ ID NO:53: Аминокислотные последовательности
 внеклеточной области человеческого TIGIT с N49A мутацией:

MMTGTIETTGNI SAEKGGSIILQCHLSSTTAQVTQVNWEQQDQLLAICAADLGWHISPS
 FKDRVAPGPGGLTLQSLTVNDTGEYFCIYHTYPDGTYTGRI FLEVLESSVAEHGARFQIPTG

SEQ ID NO:54: Аминокислотные последовательности

внеклеточной области человеческого TIGIT с D51A мутацией:

MMTGTIETTGNISAEKGGSIILQCHLSSTTAQVTQVNWEQQDQLLAICNAALGWHISPS
FKDRVAPGPGGLGLTLQSLTVNDTGEYFCIYHTYDPDGTYTGRIFLEVLESSVAEHGARFQIPTG

SEQ ID NO:55: Аминокислотные последовательности
внеклеточной области человеческого TIGIT с F86A мутацией:

MMTGTIETTGNISAEKGGSIILQCHLSSTTAQVTQVNWEQQDQLLAICNADLGWHISPS
FKDRVAPGPGGLGLTLQSLTVNDTGEYACIYHTYDPDGTYTGRIFLEVLESSVAEHGARFQIPTG

SEQ ID NO:56: Аминокислотная последовательность зрелой
тяжелой цепи анти-человеческого PD-L1 антитела

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTY
YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSAASTKG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTCTPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTKSL
LSPG

SEQ ID NO:57: Аминокислотная последовательность зрелой
легкой цепи анти-человеческого PD-L1 антитела

DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQDVSTAVAWYQQKPKAPKLLIYSASFYSGVP
SRFSGSGSTDFLTISLQPEDFATYYCQYLFTPPTFGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSLSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:58: Аминокислотная последовательность
сигнального, HA tag и линкерного пептидов, слитых со зрелым
человеческим TIGIT:

MRWCLLLIWAQGLRQAPLASGYPDVDPYAGGGGGGGGSMMTGTIETTGNISAEKGG
IILQCHLSSTTAQVTQVNWEQQDQLLAICNADLGWHISPSFKDRVAPGPGGLGLTLQSLTVNDT
EYFCIYHTYDPDGTYTGRIFLEVLESSVAEHGARFQIPLLGAMAATLVVICTAVIVVVALTRKKK
ALRIHSVEGDLRRKSAGQEWSAPSAPPSCVQAEAAPAGLCGEQRGEDCAELHDYFNLSYR
SLGNCSFFTETG

SEQ ID NO:59: Аминокислотная последовательность
внеклеточной области человеческого TIGIT, слитой с Fc областью $\gamma 1$
цепи человеческого иммуноглобулина (hTIGIT-Fc):

MMTGTIETTGNISAEKGGSIILQCHLSSTTAQVTQVNWEQQDQLLAICNADLGWHISPS

FKDRVAPGPGGLGLTLQSLTVNDTGEYFCIYHTYDPDGTYTGRIFLEVLLESSVAEHGARFQIPTGT
GGGEPKSCDKTHTCPPELLEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:60: Аминокислотная последовательность зрелой
гамма тяжелой цепи HuTIG1-IgG1.Q:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFGMHWVRQAPGKGLEWVAFISSGSSSIY
YADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCARMRLDYAMDYWGQGTMTVTVSSASTK
GPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPELLEGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGK

SEQ ID NO:61: Аминокислотная последовательность зрелой
гамма тяжелой цепи HuTIG1-IgG4.P:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFGMHWVRQAPGKGLEWVAFISSGSSSIY
YADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCARMRLDYAMDYWGQGTMTVTVS
SASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPEFLGGPSVFLFPPKPK
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCSCVMHEALHNHYTQK
SLSLSLGK

SEQ ID NO:62: Аминокислотная последовательность зрелой
гамма тяжелой цепи HuTIG3-IgG1.Q:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSDYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISDGGYNTY
YPDVTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCARQILLRYYFDYWGQGTMTVTVSSASTK
GPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPELLEGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGK

SEQ ID NO:63: Аминокислотная последовательность зрелой
гамма тяжелой цепи HuTIG3-IgG4.P:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSDYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISDGGYNTY
YPDVTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCARQILLRYYFDYWGQGTMTVTVSSASTK
GPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLM
ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSL
LGK

SEQ ID NO:64: Аминокислотная последовательность зрелой
каппа легкой цепи HuTIG1-IgG1.Q и HuTIG1-IgG4.P:

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASKSISKYLAWYQQKPKAPKLLIYSGSTLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHNEYPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:65: Аминокислотная последовательность зрелой
каппа легкой цепи HuTIG3-IgG1.Q и HuTIG3-IgG4.P:

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKSSQLLYSSNQKNYLAWYQQKPKAPKLLIYASTRESGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQYHSYPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Анти-TIGIT антитело, которое связывается с полипептидом TIGIT, содержащее CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11,

- CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12,
CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13,
CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15,
CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и
CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.
2. Анти-TIGIT антитело, которое связывается с полипептидом TIGIT, содержащее
CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19,
CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20,
CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21,
CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23,
CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, и
CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25.
3. Анти-TIGIT антитело, которое связывается с полипептидом TIGIT, содержащее
CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27,
CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28,
CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29,
CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31,
CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32, и
CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33.
4. Анти-TIGIT антитело по п.1, содержащее вариабельную область зрелой тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 35, и вариабельную область зрелой легкой цепи, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 37.
5. Анти-TIGIT антитело по п.4, где вариабельная область зрелой тяжелой цепи связана с константной областью тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 40, при условии, что С-концевой лизин может присутствовать или отсутствовать, и вариабельная область зрелой легкой цепи связана с константной областью легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 41.
6. Анти-TIGIT антитело по п.4, где вариабельная область зрелой тяжелой цепи связана с константной областью тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 60, при условии, что С-концевой лизин может присутствовать или отсутствовать, и вариабельная область зрелой легкой цепи связана с константной областью легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 64.
7. Анти-TIGIT антитело по п.4, где вариабельная область зрелой тяжелой цепи связана с константной областью тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 61, при условии, что С-концевой лизин может присутствовать или отсутствовать, и вариабельная область зрелой легкой цепи связана с константной областью легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 64.
8. Анти-TIGIT антитело по любому из пп.1-3, где анти-TIGIT антитело является химерным антителом, гуманизированным антителом или венеризированным антителом.
9. Моноклональное антитело, которое связывается с полипептидом TIGIT, содержащее
CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11,
CDR2 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12,
CDR3 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13,
CDR1 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15,
CDR2 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и
CDR3 легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17;
где моноклональное антитело обладает одним или несколькими из следующих свойств:
(а) ингибирует связывание TIGIT с CD155,
(b) повышает естественную Т-клеточную активацию в присутствии антигенпрезентирующих клеток, экспрессирующих CD155, как измерено по продукции IL-2 по сравнению с естественной Т-клеточной активацией в присутствии антигенпрезентирующих клеток, экспрессирующих CD155 и в отсутствии антитела,
(с) повышает антигенспецифическую Т-клеточную активацию, как измерено по продукции IL-12 по сравнению с антигенспецифической Т-клеточной активацией в отсутствии антитела,
(d) повышает активацию природных киллерных клеток, как измерено по продукции любого из IL-2, IL-6, TNF α или IFN γ по сравнению с активацией природных киллерных клеток в отсутствии антитела,
(е) повышает продукцию Т-клетками по меньшей мере одного провоспалительного цитокина по сравнению с продукцией Т-клетками по меньшей мере одного провоспалительного цитокина в отсутствие антитела и
(f) уменьшает продукцию Т-клетками по меньшей мере одного противовоспалительного цитокина по сравнению с продукцией Т-клетками по меньшей мере одного противовоспалительного цитокина в отсутствие антитела.
10. Моноклональное антитело по п.9, где IC₅₀ ингибирования связывания TIGIT с CD155 составляет примерно 15-100 нг/мл.
11. Моноклональное антитело по п.9, где естественная Т-клеточная активация в присутствии анти-

тела повышена примерно в 1,5-3 раза по сравнению с отсутствием антитела.

12. Моноклональное антитело по п.9, где антигенспецифическая Т-клеточная активация в присутствии антитела повышена примерно в 1,5-3 раза по сравнению с отсутствием антитела.

13. Моноклональное антитело по п.9, где активация природных киллерных клеток в присутствии антитела повышена примерно в 1,5-3 раза по сравнению с отсутствием антитела.

14. Моноклональное антитело по п.9, где продукция Т-клетками по меньшей мере одного провоспалительного цитокина в присутствии антитела повышена примерно в 1,5-3 раза по сравнению с отсутствием антитела.

15. Моноклональное антитело по п.9, где продукция Т-клетками по меньшей мере одного противовоспалительного цитокина в присутствии антитела снижена примерно в 1,5-3 раза по сравнению с отсутствием антитела.

16. Способ лечения или осуществления профилактики злокачественного новообразования, где злокачественное новообразование представляет собой солидную опухоль или гематологическую злокачественную опухоль, включающий введение индивиду, страдающему злокачественным новообразованием или имеющему риск развития злокачественного новообразования, антитела по любому из предыдущих пунктов в эффективном режиме или в терапевтически эффективном количестве.

17. Способ по п.16, где индивиду дополнительно вводят опухоль-инфильтрирующие Т-клетки, которые активируются антителом; или вакцину, индуцирующую иммунный ответ против злокачественного новообразования, который усиливается антителом; или

природные киллерные клетки, цитотоксичность которых против злокачественного новообразования усиливается антителом; или

второе антитело против антигена, экспрессированного на поверхности клеток злокачественного новообразования, при этом эффекторопосредованная цитотоксичность второго антитела против злокачественного новообразования усиливается антителом; или

второе антитело против антигена, экспрессированного на поверхности иммунной клетки; или проводят один или несколько видов терапии, выбранных из группы, состоящей из химиотерапии, облучения, клеточной терапии и хирургической операции; или

вводят ингибитор одного или нескольких рецепторов или лигандов иммунных контрольных точек.

18. Способ по п.16, где солидная опухоль представляет собой рак легкого.

19. Способ по п.17, где вакцина содержит антиген или его фрагмент, экспрессируемый на поверхности злокачественных клеток.

20. Способ по п.17, где иммунная клетка представляет собой Т-клетку или природную киллерную клетку.

21. Способ по п.17, где антиген, экспрессированный на поверхности иммунной клетки, представляет собой CTLA-4, PD-1 или PD-L1.

22. Способ по п.17, где ингибитор выбран из группы, состоящей из ипилимумаба, ниволумаба, пембролизумаба (ламбролизумаб) и атезолизумаба.

23. Способ лечения индивиду, инфицированного патогеном, выбранным из группы, состоящей из вируса, бактерии, гриба и простейшего, включающий введение индивиду антитела по любому из предшествующих пунктов в эффективном режиме или в терапевтически эффективном количестве.

24. Способ по п.23, где индивиду также вводят второе антитело против патогена, где эффекторопосредованная цитотоксичность второго антитела против патогена усиливается антителом; или где индивиду дополнительно вводят одно или несколько противовирусных средств, антипаразитарных средств, антибактериальных средств или противогрибковых средств.

25. Способ по п.23, где патоген представляет собой ВИЧ, ВСГ, вирус гепатита, вирус герпеса, аденовирус, вирус гриппа, флавивирус, эховирус, риновирус, вирус Коксаки, коронавирус, респираторный синцитиальный вирус, вирус эпидемического паротита, ротавирус, вирус кори, вирус краснухи, парвовирус, вирус коровьей оспы, HTLV вирус, вирус денге, папилломавирус, вирус моллюска, полиовирус, вирус бешенства, JC вирус, вирус арбовирусного энцефалита, хламидии, бактерии риккетсии, микобактерии, стафилококки, стрептококки, пневмококки, менингококки, гонококки, клебсиеллу, протеус, серрацию, псевдомонас, легионеллу, дифтерийную палочку, палочку сальмонеллы и бактерии, вызывающие холеру, столбняк, ботулизм, сибирскую язву, чуму, лептоспироз и болезнь Лайма.

26. Способ лечения злокачественного новообразования, где злокачественное новообразование представляет собой солидную опухоль или гематологическую злокачественную опухоль, включающий введение индивиду, страдающему злокачественным новообразованием, терапевтически эффективного количества антитела по любому из предшествующих пунктов.

27. Способ по п.26, где индивиду дополнительно вводят опухоль-инфильтрирующие Т-клетки, которые активируются антителом; или вводят вакцину, индуцирующую иммунный ответ против злокачественного новообразования, который усиливается антителом; или

вводят природные киллерные клетки, цитотоксичность которых против злокачественного новооб-

разования усиливается антителом; или

вводят второе антитело против антигена, экспрессированного на поверхности злокачественных клеток, при этом эффектор-опосредованная цитотоксичность второго антитела против злокачественного новообразования усиливается антителом; или

вводят второе антитело против антигена, экспрессированного на поверхности иммунной клетки; или

проводят один или несколько видов терапии, выбранных из группы, состоящей из химиотерапии, облучения, клеточной терапии и хирургической операции; или

вводят ингибитор одного или нескольких рецепторов или лигандов иммунных контрольных точек.

28. Способ по п.26, где солидная опухоль представляет собой рак легкого.

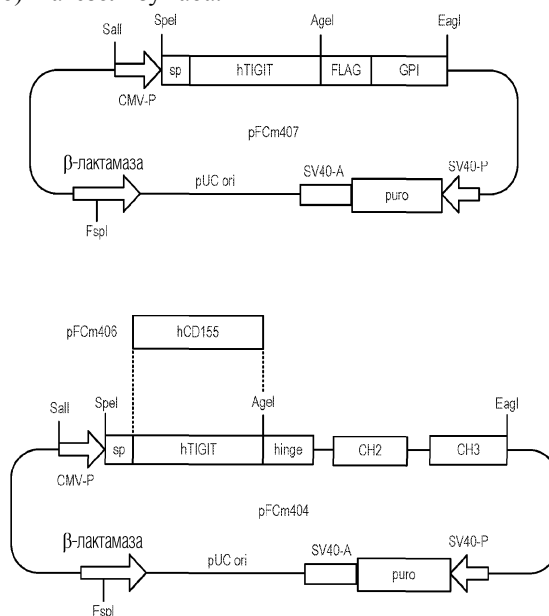
29. Способ по п.27, где вакцина включает антиген, экспрессированный на поверхности злокачественных клеток, или его фрагмент.

30. Способ по п.27, где иммунная клетка представляет собой Т-клетку или природную киллерную клетку.

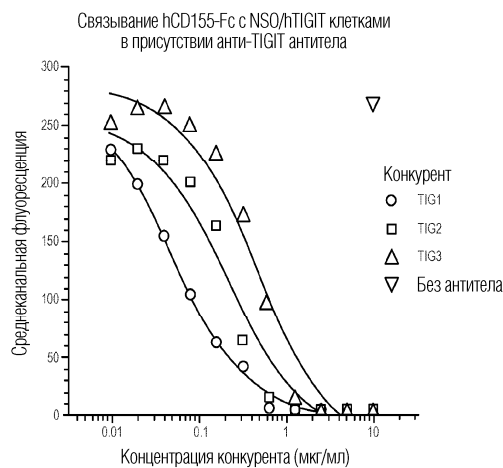
31. Способ по п.27, где антиген, экспрессированный на поверхности иммунной клетки, представляет собой CTLA-4, PD-1 или PD-L1.

32. Способ по п.27, где один или несколько рецепторов или лигандов иммунных контрольных точек выбраны из группы, состоящей из CTLA-4, PD-1, PD-L1, TIM-3, LAG-3, BTLA, VISTA, CD96, A2aR, A2bR, Аргиназы, CD39, CD73, IDO и TDO.

33. Способ по п.27, где ингибитор выбран из группы, состоящей из ипилимумаба, ниволумаба, пембролизумаба (ламбролизумаб) и атезолизумаба.



Фиг. 1



Фиг. 2

041301

TIG1 VH

1 2 3
123456789 0123456789 0123456789 0123456789
DVQLVESGG GLVQPGGSRK LSCAASGFTF SNFCMHWWRQ
CDR1

4 5 6 7
0123456789 01223456789 0123456789 0123456789
APEKGLEWVA FISSGSSSIY ADTVKGRFTI SRDNPKNLTF
CDR2

8 9 1 1
0122223456789 0123456789 000123456789 0123
abc ab
LQMTSLRSEDAM YYCARMRLDY YAMDYWGQGTSV TVSS
CDR3

Фиг. 3

TIG1 VL

1 2 3
123456789 0123456789 0123456789 0123456789
DVQITQSPS YLAAS PGETI TINCRASKSI SKYLAWYQEK
CDR1

4 5 6 7
0123456789 0123456789 0123456789 0123456789
PGKTNKLLIY SGSTLQSGIP SRFSGSGSGT DFTLISSLE
CDR2

8 9 1
0123456789 0123456789 01234567
PEDFAMYQCQ QHNEYPWIFG GGTKLEIK
CDR3

Фиг. 4

TIG2 VH

1 2 3
123456789 0123456789 0123456789 0123456789
EVQLQQSGP ELVKPGASVK ISCKTSGYTF TEYTMHWKQ
CDR1

4 5 6 7
0123456789 01223456789 0123456789 0123456789
a
SHGKNLEWIG GINPNNGGTSY NQKFKGRATL TVDKSSSTAY
CDR2

8 9 1 1
0122223456789 0123456789 000123456789 0123
abc ab
MELRSLTSDSAV YYCARPGWYN YAMDYWGQGTSV TVSS
CDR3

Фиг. 5

041301

TIG2 VL

1 2 3
123456789 0123456789 0123456789 0123456789
DIVMTQSHK FMSTSVGDRV NITCKASQGV STAVAWYQQK
CDR1

4 5 6 7
0123456789 0123456789 0123456789 0123456789
PGQSPKLLIY SASYRYTIGVP DRFTGSGSGT DFTFTISSVQ
CDR2

1
8 9 0
0123456789 0123456789 01234567
AEDLAVYHCQ QHYYTPWTFG GGTKLEIK
CDR3

Фиг. 6

TIG3 VH

1 2 3
123456789 0123456789 0123456789 0123456789
EVQLVESGG GLVKFPGSLK LSCAASGFAP SDYDMSWWRQ
CDR1

4 5 6 7
0123456789 0123456789 0123456789 0123456789
^a
TPEKRLEWVA YISDGGYNTYY PDTVKGRETI SRDNAKNTLY
CDR2

1 1
8 9 0 1
0122223456789 0123456789 000123456789 0123
^{abc} ^{ab}
LQMSLLKSEDTAI YYCARQILLR YYFDYWGQGTTL TVSS
CDR3

Фиг. 7

TIG3 VL

1 2 3
123456789 0123456789 012345677777789 0123456789
^{abcdef}
DIVMSQSPS SLAVSVGEKV TMTCKSSQSLLYSSNQ KNYLAWYQQK
CDR1

4 5 6 7
0123456789 0123456789 0123456789 0123456789
PGQSPKLLIY WASTRESGVP DRFTGSGSGT DFTLTISSVK
CDR2

1
8 9 0
0123456789 0123456789 01234567
AEDLAVYYCQ QYHSYPWTFG GGTKLEIK
CDR3

Фиг. 8

041301

HuTIG1 VH gene

```

ACTAGTACCACCACCGACTCCAGGCTCAATCTGGTTTTCTGTGCTTATTCTGAAAGGC
      M D S R L N L V F L V L I L K G
GTCAGTGTGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCGCTGTCAGCCTGGAGGGTCC
      V Q C E V Q L V E S G G G L V Q P G G S
CTGAGACTCTCTGTGTCAGGCTCTGGATTCACTTCAGTAACTTGGAAATGCACCTGGGT
      L R L S C A A S G F T F S N F G M H W V
CGACAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGTCCGATTGATTAGTAGTGGCAGTAGTTCC
      R Q A P G K G L E W V A F I S S G S S S
ATCTACTATGCAGACACAGTGAAGGGCCGATTCCACATCTCCAGAGACAATGCCAAGAAC
      I Y Y A D T V K G R F T I S R D N A K N
AGCCTGTACCTGCAAATGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACTGCCGTGATTACTGTGCA
      S L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A
AGAATGAGACTGGATTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCATGGTCACCGTC
      R M R L D Y Y A M D Y W G Q G T M V T V
TCCTCAGGTAAGTATGGCCTCTAAGCTT (SEQ ID NO:38)
S S (SEQ ID NO:34)
    
```

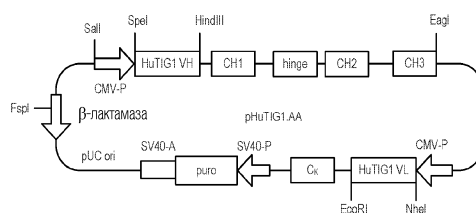
Фиг. 9А

HuTIG1 VL gene

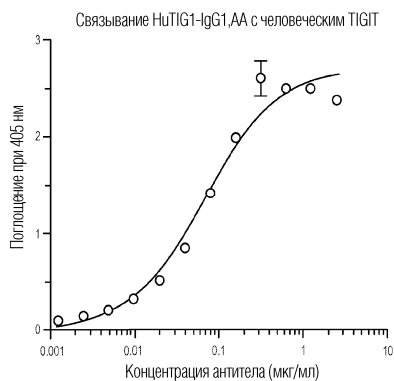
```

GCTAGCACCCACCATGAGGTTCCAGGTTCCAGGTTCTGGGGCTCCTTCTGCTCTGGATCTCA
      M R F Q V Q V L G L L L L W I S
GGAGCCAGTGTGATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCTTTCTGCATCTGTGGA
      G A Q C D I Q M T Q S P S S L S A S V G
GATAGAGTCACTATTACTTGCAGGGCAAGTAAGAGCATTAGCAATATCTGGCCCTGGTAT
      D R V T I T C R A S K S I S K Y L A W Y
CAACAGAACCTGGGAAAGCTCCTAAGCTGCTTATCTACTCTGGTCCACTTTGCAATCT
      Q Q K P G K A P K L L I Y S G S T L Q S
GGAGTTCATCAAGATTCAAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGATTCACTCTCACCATCAGT
      G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S
AGCCTGCAGCCTGAAGATTTTCAACCTATTACTGTCAACGCATAATGAATACCCCTGG
      S L Q P E D F A T Y Y C Q Q H N E Y P W
ACCTTCGGCGGAGGACCAAGTCCGAAATCAACGTAAAGTAAATCCAAAGAATTC (SEQ ID NO:39)
      T F G G G T K V E I K (SEQ ID NO:35)
    
```

Фиг. 9В

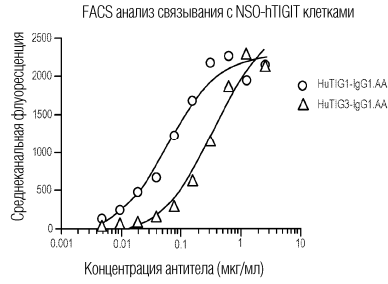


Фиг. 10

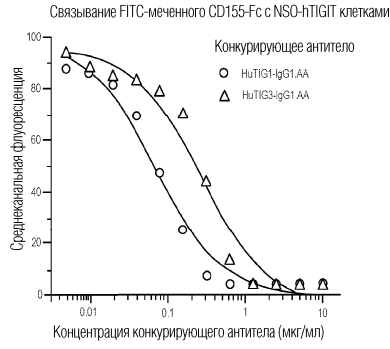


Фиг. 11

041301



Фиг. 12



Фиг. 13

HuTIG3 VH ген

```
ACTAGTACCACCATGAACSTTGGGCTCAGATTGATTTTCCTTGTCCCTACTCTGAAAAGGC
      M N F G L R L I F L V L T L K G
GTGAACSTGTGAAGTCCAGCTCGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTTGTGCAGCCTGGAGGGTCC
V N C E V Q L V E S G G G L V Q P G G S
CTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTTCCTTTCAGTACTATGACATGTCTTGGGTT
L R L S C A A S G F A F S D Y D M S W V
CGCCAGGCTCCTGGCAAGGGCTCGAGTGGTGCATACATTAGTGATGGCGTTATAAC
R Q A P G K G L E W V A Y I S D G G Y N
ACSTACTATCCAGACACTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAAC
T Y Y P D T V K G R F T I S R D N A K N
TCCCTGTACSTCCAAATGAACAGTCTGAGGGCTGAGGACACAGCCGCTATTACTGTGCA
S L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A
AGACAAATTCTGCTGCGTACTACTTTGACTACTGGGGCCAAAGGCCACACTGTCCACAGTC
R Q I L L R Y Y F D Y W G Q G T T V T V
TCCTCAGGTGAGTCCTTAAAACAAGCTT (SEQ ID NO.46)
S S (SEQ ID NO.42)
```

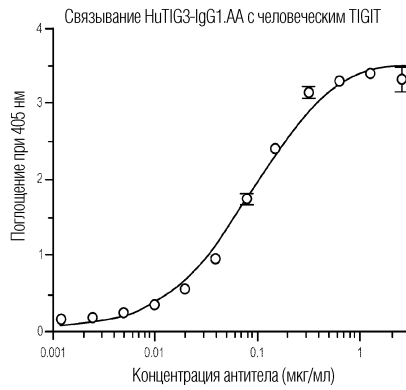
Фиг. 14А

HuTIG3 VL ген

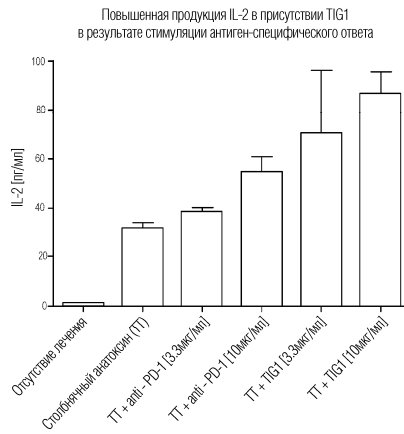
```

GCTAGCACCCACATGGATTACAGGCCACAGTTCTTATGCTGCTGCTCTGGGTTTCT
      M D S Q A Q V L M L L L L W V S
GGAACCTGTGGGACATTCAGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCCTCAGTTGGA
      G T C G D I Q M T Q S P S S L S A S V G
GACAGGGTACTATACCTGCAAGTCCAGTCCAGTCTTCTGTATAGTACCAATCAAAG
      D R V T I T C K S S Q S L L Y S S N Q K
AACTACTTGGCCTGTTACCAGCAGAAACAGGGAAGGCTCCTAACTGCTGATTTACTGG
      N Y L A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y W
GCATCCACTAGGGAATCTGGGTCCTAGTCGCTTCTCAGGCAGTGGATCTGGGACAGAT
      A S T R E S G V P S R F S G S G S G T D
TTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAGCCTGAAGACTTCGACGTTTACTGTCCAGAA
      F T L T I S S L Q P E D F A V Y Y C Q Q
TATCATAGCTATCCCTGGACCTTCGCGGAGGCACCAAGTGGAAATCAAACGTAAGTAG
      Y H S Y P W T F G G G T K V E I K (SEQ ID NO:44)
AATCCAAAGAATTC (SEQ ID NO:47)
    
```

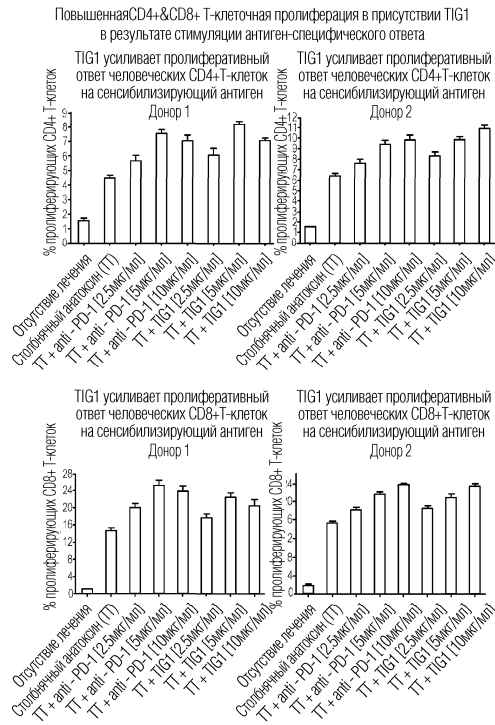
Фиг. 14В



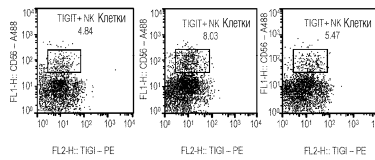
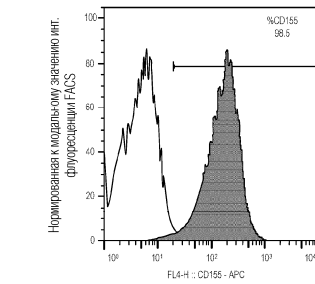
Фиг. 15



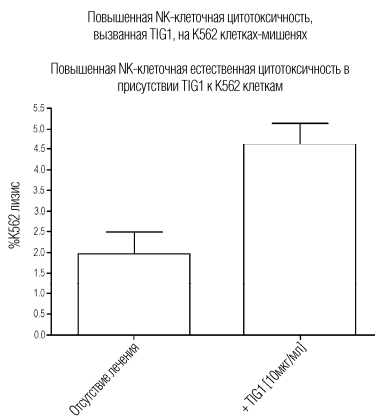
Фиг. 16



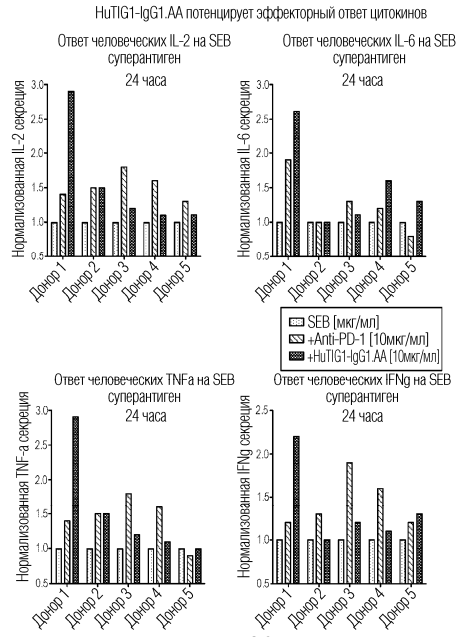
Фиг. 17



Фиг. 18

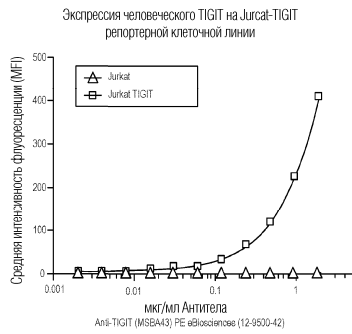


Фиг. 19



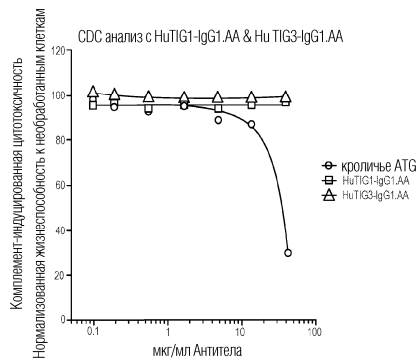
Фиг. 20

Jurkat-TIGIT клеточная линия экспрессирует TIGIT на поверхности клеток



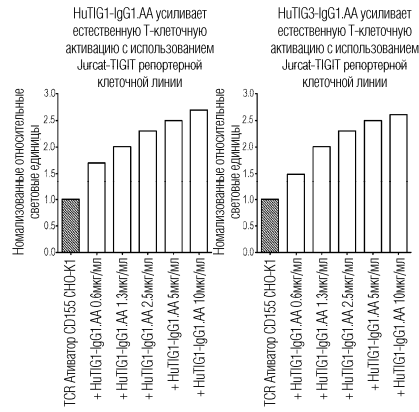
Фиг. 21

HuTIG1-IgG1.AA & Hu TIG3-IgG1.AA не вызывает активность CDC



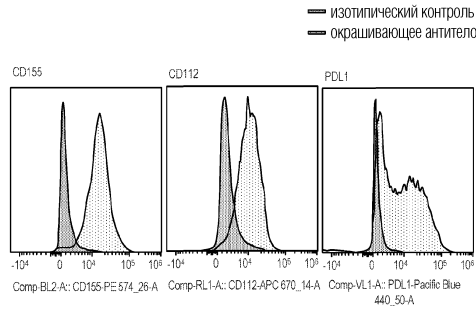
Фиг. 22

Анализ Т-клеточной антагонистической активности in vitro для анти-человеческих антител к TIGIT

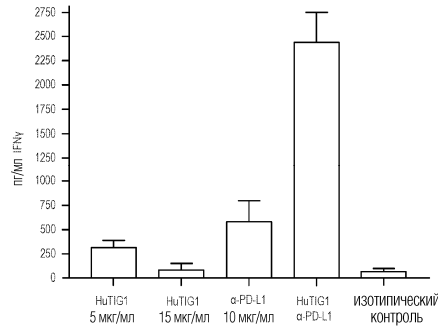


Фиг. 23

Анализ Т-клеточной антагонистической активности in vitro для анти-человеческих антител к TIGIT

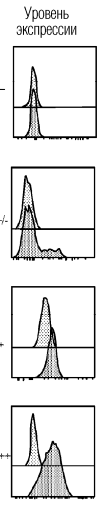


Фиг. 24

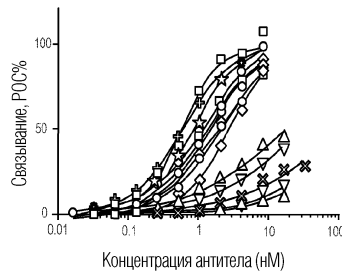


Фиг. 25

		Subпопуляции	Клетки плазматического класса	α-TIGIT		
				HiTIG1	HiTIG2	α-CD96
Лимфоидные	В клетки	В1	CD19 ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺			
		Наивные	CD19 ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺			
		Плазматические клетки/плазмобласты	CD19 ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺			
	NK клетки	CD56 ⁺	CD56 ⁺ CD16 ⁺	+++	+++	
		γδT клетки	TCRγδ ⁺			
	CD4 T клетки	Наивные	CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CCR7 ⁺		+	-
		Эффекторные	CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CCR7 ⁻			
		EM	CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CCR7 ⁻	++	++	++
		SM	CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CCR7 ⁻	+	+	+
		CD25 ⁺ Treg	CD4 ⁺ CD25RA ⁺ CD127 ⁻	+++	+++	++
CD8 T клетки	Наивные	CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CCR7 ⁺				
	Эффекторные	CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CCR7 ⁻	+++	+++	+++	
	EM	CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CCR7 ⁻	++	++	++	
Миелоидные	Дендритные клетки	Плазмацитоидные	CD56 ⁺ CD141 ⁺ CLEC9a ⁺ CD14 ⁺ CD123 ⁺ HLA-DR ⁺			
		ВДСА3 ⁺	CD56 ⁺ CLEC9a ⁺ CD141 ⁺ HLA-DR ⁺			
	Миелоидные		CD56 ⁺ CD141 ⁺ CLEC9a ⁺ CD14 ⁺ CD33 ⁺ HLA-DR ⁺			
		Классические	CD56 ⁺ CD141 ⁺ CLEC9a ⁺ CD14 ⁺ CD16 ⁺ HLA-DR ⁺			
	Моноцитарные	Воспалительные	CD56 ⁺ CD141 ⁺ CLEC9a ⁺ CD14 ⁺ CD16 ⁺ HLA-DR ⁺	+	+	+++
		CD16hi CD14lo	CD56 ⁺ CD141 ⁺ CLEC9a ⁺ CD14 ⁺ CD33 ⁺ HLA-DR ⁺			

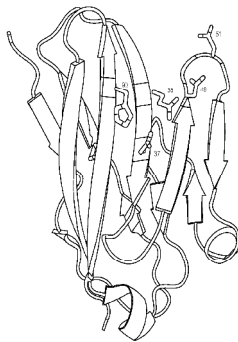


А В
Фиг. 26

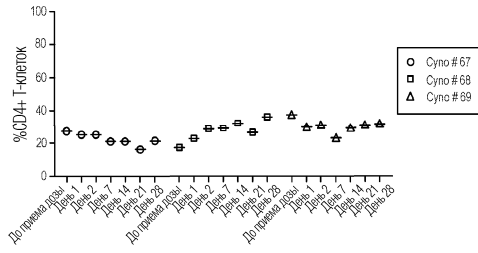


Variant	EC50
WT	1.28
T34A	0.577
Q35A	176
N37A	126
E39A	1.58
L44A	1.23
I47A	1.27
N49A	17.7
D51A	30.5
L52A	2.67
H55A	1.19
F86A	0.844
I88A	0.591
H90A	104
Y92A	2.12
T96A	1.36

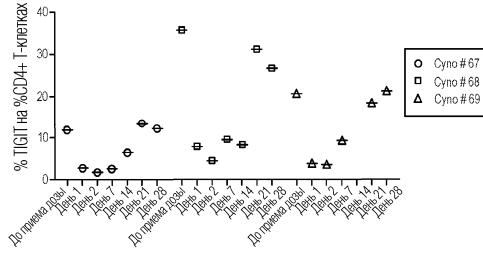
Фиг. 27



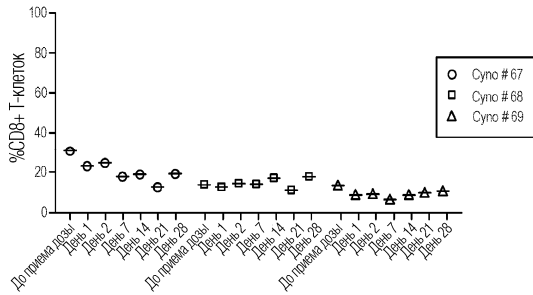
Фиг. 28



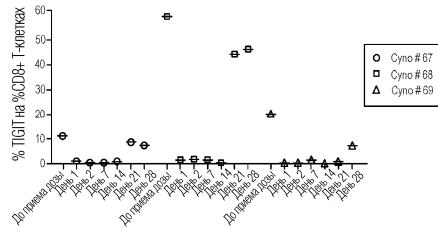
Фиг. 29А



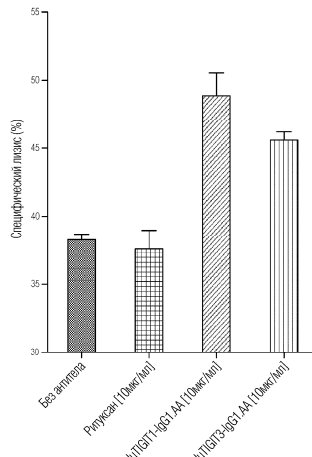
Фиг. 29В



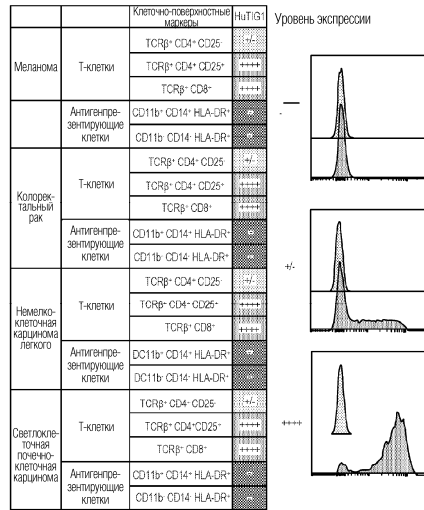
Фиг. 30А



Фиг. 30В



Фиг. 31



А

В

Фиг. 32

