(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202192796 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.03.03

(22) Дата подачи заявки
2020.05.22

(51) Int. Cl. ***C07K 16/28*** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) TIGIT И PD-1/TIGIT-СВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ

(31) **62/853,816**
(32) **2019.05.29**
(33) **US**
(86) **PCT/US2020/034158**
(87) **WO 2020/242919 2020.12.03**

(71) Заявитель:
ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)

(72) Изобретатель:
Фэн Ицин, Кумар Нареш, Панкук Джеймс Дэвид, Трухлар Стефани Мари, Чжао Ян (US)

(74) Представитель:
Парамонова К.В., Угрюмов В.М., Христофоров А.А., Гизатуллин Ш.Ф., Гизатуллина Е.М., Костюшенкова М.Ю., Строкова О.В. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к полипептидным молекулам, которые связываются с TIGIT человека, и к полипептидным молекулам, которые связываются с PD-1 человека и TIGIT человека, которые можно применять для лечения солидных опухолей, отдельно и в комбинации с химиотерапией и/или ионизирующим излучением.

202192796 A1

202192796 A1

TIGIT И PD-1/TIGIT-СВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ

Настоящее изобретение относится к области медицины. В частности, настоящее изобретение относится к новым полипептидным молекулам, которые являются антагонистами TIGIT человека или которые являются антагонистами как на TIGIT человека, так и на PD-1 человека, композициям, содержащим такие полипептидные молекулы, и способам применения таких полипептидных молекул для лечения солидных опухолей, по отдельности или в комбинации с химиотерапией и другими терапевтическими средствами для лечения рака.

Контрольные точки иммунного ответа представляют собой группу мембранных белков, экспрессируемых на иммунных клетках (например, Т-клетках и дендритных клетках), включая множество коингибирующих и костимулирующих рецепторов, которые играют важную роль в регуляции адаптивного иммунного ответа. Контрольные точки включают лиганд запрограммированной гибели клеток человека (PD-1) (NCBI NP_005009.2) и иммунорецептор Т-клеток человека с доменами Ig и ITIM (TIGIT) (NCBI NP_776160.2).

Взаимодействие между PD-1 и его лигандами, лигандом запрограммированной гибели клеток 1 (PD-L1) и лигандом запрограммированной гибели клеток 2 (PD-L2), обеспечивает ингибирующий сигнал, который, как было показано, играет ключевую роль в ускользании опухоли от иммунного надзора и иммуносупрессии, которая возникает в опухолевой микросреде. Несмотря на то, что блокада ингибирующей передачи сигналов PD-1 с помощью антител к PD-1 и/или антител к PD-L1 клинически подтверждена и привела к значительным клиническим достижениям в лечении определенных видов рака, есть много пациентов, которые либо не отвечают, либо имеют рецидив, либо приобретают устойчивость к способу (ам) лечения антителами к PD-1 или PD-L1, или иным образом не переносят лечение.

TIGIT представляет собой коингибирующий рецептор, экспрессируемый, как и PD-1, на активированных и истощенных Т-клетках. TIGIT связывается с рецептором полиовируса (PVR, также известным как CD155) на опухолевых клетках и обеспечивает обратную передачу сигналов в опухолевые клетки, что приводит к секреции цитокинов, подавляющих Т-клетки. Хотя CD155 считается доминирующим лигандом для TIGIT, TIGIT также может взаимодействовать с CD112 и CD113 (Blake et al., *Clin Cancer Res*; *2016*; 22(21): 5182-5188). Была исследована роль TIGIT как ингибирующего рецептора контрольных точек иммунного ответа. TIGIT является частью пути CD226/TIGIT, в котором TIGIT не только конкурирует с CD226, костимулирующим иммунным рецептором, за связывание с CD155, но также напрямую взаимодействует с CD226 в

клеточной мембране и блокирует гомодимеризацию CD226 (Blake et al., S, *Clin Cancer Res*; *2016*; 22(21): 5182-5188; Johnston et al., *Cancer Cell 2014*; 26: 923–937; Mahnke et al, *Journal of Investigative Dermatology 2016*; 136: 9-11).

Антитела к TIGIT известны в данной области техники, включая те, которые раскрыты в US 2016/0355589, US 2017/143825, US 2017/088613, US 2016/376365, US 2018/169238, US 2016/176963 и US 2019/100591. Однако ни одно антитело к TIGIT человека не получило одобрения регулирующих органов для применения в терапевтических целях у человека в виде монотерапии или в комбинации с антителом к PD-L1 человека или антителом к PD-1 человека. Кроме того, ни одно биспецифичное антитело, нацеленное на TIGIT и PD-1 или TIGIT и PD-L1, не получило одобрения регулирующих органов для применения в терапевтических целях у человека. Таким образом, существует потребность в дополнительных способах лечения, нацеленных на пути контрольных точек иммунного ответа.

Соответственно, настоящее изобретение направлено на новые антитела к TIGIT человека и новые биспецифичные антитела к TIGIT человека/PD-1 человека. Кроме того, в отличие от других антител к TIGIT человека, антитела согласно настоящему изобретению лишены эффекторной функции, т.е. сконструированы для минимизации связывания с рецептором Fc. Таким образом, в отличие от других антител к TIGIT человека, антитела согласно настоящему изобретению не содержат каркас нативного IgG1 человека, который может способствовать истощению регуляторных Т-клеток и возникновению нежелательных явлений из-за иммунного ответа. Кроме того, биспецифичные антитела к TIGIT человека/PD-1 человека согласно настоящему изобретению содержат различные типы легких цепей, причем легкая цепь плеча против TIGIT человека представляет собой легкую каппа-цепь, и легкая цепь против PD-1 человека представляет собой легкую лямбда-цепь, что способствует образованию гетеромоноклонального (гетеро-МАТ, «heteromab») биспецифичного антитела за счет уменьшения способности к димеризации легкая цепь-легкая цепь.

Общеизвестно, что получение биспецифичных молекул является непредсказуемым начинанием. Например, совместная экспрессия двух тяжелых цепей и двух легких цепей с образованием биспецифичного антитела IgG может привести к некоторой неправильной сборке и нежелательным побочным продуктам, гетеродимерным взаимодействиям в пределах Fab антител (Lewis SM *et al.*, *Nature Biotechnology 2014*; 32: 191-202; Leaver-Fay A, *et al.*, *Structure 2016*; 24: 641-651). Таким образом, согласно настоящему изобретению предложена биспецифичная молекула против TIGIT человека/PD-1 человека, которая минимизировала связывание рецептора Fc, минимизирует окисление, способствует сборке

гетеро-МАТ, обладает перекрестной реактивностью с TIGIT/PD-1 человека и TIGIT/PD-1 яванской макаки, и проявляет эффективность *in vivo* в установленной опухолевой модели.

Биспецифичное антитело к TIGIT человека/PD-1 человека согласно настоящему изобретению неожиданно демонстрирует значительную противоопухолевую эффективность *in vivo* по сравнению с комбинированной терапией антителом к PD-1 человека и антителом к TIGIT человека. Более неожиданно, что лечение биспецифичным антителом согласно настоящему изобретению приводит к увеличению процента как $CD226^+$ CD8 Т-клеток, так и $CD226^+$ NK-клеток, что может вносить вклад в наблюдаемую значительную эффективность *in vivo*.

Согласно настоящему изобретению также предложена полипептидная молекула, которая связывается с TIGIT человека (SEQ ID NO: 31) или с внеклеточным доменом TIGIT человека, например, SEQ ID NO: 32, содержащая аминокислотные последовательности областей, определяющих комплементарность (CDR), тяжелой и легкой цепей, имеющие SEQ ID NO: 1-6 (см. Таблицу 1). Согласно одному варианту реализации полипептид дополнительно содержит аминокислотные последовательности CDR, имеющие SEQ ID NO: 7-12, причем указанная полипептидная молекула также связывается с PD-1 человека (SEQ ID NO: 29) или с внеклеточным доменом PD-1, например, SEQ ID NO: 30.

Согласно одному варианту реализации полипептидная молекула представляет собой молекулу scFv. Согласно другому варианту реализации полипептидная молекула представляет собой полиспецифичную молекулу scFv. Согласно другому варианту реализации полиспецифичная молекула scFv представляет собой биспецифичную молекулу scFv.

Согласно одному варианту реализации полипептидная молекула представляет собой антитело или его фрагмент, связывающий TIGIT человека, содержащие три HCDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1-3, соответственно, и три LCDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4-6, соответственно. Согласно другому варианту реализации полипептидная молекула представляет собой антитело. Согласно другому варианту реализации антитело представляет собой моноспецифичное антитело. Согласно другому варианту реализации антитело представляет собой полиспецифичное антитело. Согласно другому варианту реализации антитело представляет собой биспецифичное антитело, которое также связывается с PD-1 человека.

Согласно другому варианту реализации полипептидная молекула представляет собой антитело или его фрагмент, связывающий TIGIT человека, содержащие

вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. Согласно другому варианту реализации полипептидная молекула представляет собой антитело, содержащее тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22.

Согласно другому варианту реализации антитело или его фрагмент, связывающий TIGIT человека, также связывается с PD-1 человека (SEQ ID NO: 31) или с внеклеточным доменом TIGIT человека, например, SEQ ID NO: 32, и с PD-1 человека (SEQ ID NO: 29) или с внеклеточным доменом PD-1 человека, например, SEQ ID NO: 30, и дополнительно содержит три HCDR, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7-9, соответственно, и три LCDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10-12, соответственно.

Согласно другому варианту реализации полипептидная молекула представляет собой антитело, или его фрагмент, связывающий TIGIT человека и PD-1 человека, содержащее: вариабельную область первой тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; вариабельную область первой легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; вариабельную область второй тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17; и вариабельную область второй легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

Согласно другому варианту реализации полипептидная молекула представляет собой антитело, содержащее: первую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21; первую легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; вторую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; и вторую легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24.

Согласно настоящему изобретению также предложена клетка млекопитающего, способная экспрессировать полипептидную молекулу согласно настоящему изобретению.

Согласно настоящему изобретению также предложена молекула ДНК, содержащая полинуклеотид, кодирующий одну или более аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 24. Согласно настоящему изобретению также предложена молекула ДНК по п. 17, характеризующаяся тем, что указанный полинуклеотид содержит одну или более последовательностей ДНК, имеющих SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 28.

Согласно настоящему изобретению также предложена клетка млекопитающего, содержащая молекулу ДНК согласно настоящему изобретению. Согласно настоящему изобретению также предложен способ получения антитела, включающий культивирование клетки млекопитающего согласно настоящему изобретению и выделение полипептидной молекулы. Согласно настоящему изобретению также предложена полипептидная молекула, полученная с помощью указанного способа.

Согласно настоящему изобретению также предложена фармацевтическая композиция, содержащая полипептидную молекулу согласно настоящему изобретению и приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ лечения солидной раковой опухоли, включающий введение пациенту-человеку, нуждающемуся в этом, эффективного количества полипептидной молекулы согласно настоящему изобретению. Согласно одному варианту реализации солидная раковая опухоль представляет собой рак легкого, рак молочной железы, рак головы и шеи, меланому, рак печени, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак почки, рак предстательной железы, рак яичника, рак эндометрия или гепатоцеллюлярную карциному. Согласно другому варианту реализации рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого или мелкоклеточный рак легкого. Согласно другому варианту реализации рак молочной железы представляет собой трижды отрицательный рак молочной железы. Согласно другому варианту реализации полипептидную молекулу вводят в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с ионизирующим излучением. Согласно другому варианту реализации полипептидную молекулу вводят в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с одним или более химиотерапевтическими агентами.

Согласно настоящему изобретению также предложена полипептидная молекула согласно настоящему изобретению для применения в терапии. Согласно одному варианту реализации применение представляет собой применение в лечении солидной раковой опухоли. Согласно другому варианту реализации солидная раковая опухоль представляет собой рак легкого, рак молочной железы, рак головы и шеи, меланому, рак печени, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак почки, рак предстательной железы, рак яичника, рак эндометрия или гепатоцеллюлярную карциному. Согласно другому варианту реализации рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого или мелкоклеточный рак легкого. Согласно другому варианту реализации рак молочной железы представляет собой трижды отрицательный рак молочной железы. Согласно другому варианту реализации полипептидную молекулу

вводят в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с ионизирующим излучением. Согласно другому варианту реализации полипептидную молекулу вводят в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с одним или более химиотерапевтическими агентами.

Согласно настоящему изобретению также предложено применение полипептидной молекулы согласно настоящему изобретению в изготовлении лекарственного средства для лечения солидной раковой опухоли. Согласно одному варианту реализации применение представляет собой применение в лечении солидной раковой опухоли. Согласно другому варианту реализации солидная раковая опухоль представляет собой рак легкого, рак молочной железы, рак головы и шеи, меланому, рак печени, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак почки, рак предстательной железы, рак яичника, рак эндометрия или гепатоцеллюлярную карциному. Согласно другому варианту реализации рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого или мелкоклеточный рак легкого. Согласно другому варианту реализации рак молочной железы представляет собой трижды отрицательный рак молочной железы. Согласно другому варианту реализации полипептидную молекулу вводят в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с ионизирующим излучением. Согласно другому варианту реализации полипептидную молекулу вводят в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с одним или более химиотерапевтическими агентами.

Согласно одному варианту реализации антитело согласно настоящему изобретению представляет собой биспецифичное антитело. Биспецифичные антитела согласно настоящему изобретению разработаны так, чтобы способствовать гетеродимерному спариванию двух различных тяжелых цепей и препятствовать образованию гомодимеров. Предпочтительно биспецифичные антитела, описанные в данном документе, содержат часть Fc, которая происходит из IgG1 человека. Известно, что IgG1 человека связывается с белками из семейства гамма-рецепторов Fc (FcγR), а также с C1q. Связывание IgG1 с FcγR или C1q индуцирует антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) и комплемент-зависимую цитотоксичность (КЗЦ), соответственно. Таким образом, предпочтительно антитела, описанные в данном документе, представляют собой IgG1 человека, сконструированный для уменьшения связывания антитела с FcγR, а также C1q. Предпочтительно аминокислотные замены положений L234A, L235A и P329A согласно нумерации EC вводят в область CH2 для уменьшения связывания антитела с FcγR, а также C1q. Необязательно аминокислотную

замену положения N297Q согласно нумерации ЕС вводят для дополнительного уменьшения активности АЗКЦ и КЗЦ антитела.

Последовательности каркаса и CDR в каждом из антител, для которых в данном документе изложены последовательности, аннотированы с использованием правил аннотации в соответствии с методом North, et al. *J. Mol. Biol. 2011;* 406: 228-256.

Согласно настоящему изобретению также предложено антитело, которое связывается с TIGIT человека (SEQ ID NO: 31) или с внеклеточным доменом TIGIT, например, SEQ ID NO: 32, содержащее:

a) тяжелую цепь, содержащую HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; и

b) легкую цепь, содержащую LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

Согласно настоящему изобретению также предложено антитело, содержащее:

a) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; и

b) вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

Согласно настоящему изобретению также предложено антитело, содержащее:

a) тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21; и

b) легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22.

Согласно одному варианту реализации тяжелая цепь антитела образует по меньшей мере одну дисульфидную связь с легкой цепью антитела, и две тяжелые цепи антитела образуют по меньшей мере одну дисульфидную связь.

Согласно другому варианту реализации антитело представляет собой IgG1 человека, сконструированный для уменьшения связывания антитела с гамма-рецептором Fc.

Согласно настоящему изобретению также предложена молекула ДНК, содержащая полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере один полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21 и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22. Согласно предпочтительному варианту реализации

молекула ДНК содержит полинуклеотид, содержащий по меньшей мере одну из SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 26.

Согласно настоящему изобретению также предложена клетка млекопитающего, содержащая молекулу ДНК, содержащую полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере один полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21 и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ получения антитела, включающий культивирование клетки млекопитающего, способной экспрессировать антитело, и выделение антитела, содержащего:

a) тяжелую цепь, содержащую HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; и

b) легкую цепь, содержащую LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

Согласно одному варианту реализации тяжелая цепь антитела образует по меньшей мере одну дисульфидную связь с легкой цепью антитела, и две тяжелые цепи антитела образуют по меньшей мере одну дисульфидную связь.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ получения антитела, включающий культивирование клетки млекопитающего, способной экспрессировать антитело, и выделение антитела, содержащего:

a) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; и

b) вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ получения антитела, включающий культивирование клетки млекопитающего, способной экспрессировать антитело, и выделение антитела, содержащего:

a) тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21; и

b) легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ получения антитела, включающий культивирование клетки млекопитающего, способной экспрессировать

антитело, и выделение антитела; причем указанное антитело представляет собой IgG1 человека, сконструированный для уменьшения связывания указанного антитела с гамма-рецептором Fc.

Согласно настоящему изобретению также предложено антитело, полученное с помощью способа, включающего культивирование клетки млекопитающего, способной экспрессировать антитело, и выделение антитела, причем указанное антитело содержит:

a) тяжелую цепь, содержащую HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; и

b) легкую цепь, содержащую LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

Согласно одному варианту реализации тяжелая цепь антитела образует по меньшей мере одну дисульфидную связь с легкой цепью антитела, и две тяжелые цепи антитела образуют по меньшей мере одну дисульфидную связь.

Согласно настоящему изобретению также предложено антитело, полученное с помощью способа, включающего культивирование клетки млекопитающего, способной экспрессировать антитело, и выделение антитела, содержащего:

a) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13;

b) вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

Согласно настоящему изобретению также предложено антитело, полученное с помощью способа, включающего культивирование клетки млекопитающего, способной экспрессировать антитело, и выделение антитела, содержащего:

a) тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21;

b) легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22.

Согласно настоящему изобретению также предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело, причем указанное антитело связывается с TIGIT человека (SEQ ID NO: 31) или с внеклеточным доменом TIGIT человека, например, SEQ ID NO: 32, содержащее:

a) тяжелую цепь, содержащую HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, HCDR2, имеющую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 2, и HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; и

b) легкую цепь, содержащую LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6,

и приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

Согласно одному варианту реализации тяжелая цепь антитела образует по меньшей мере одну дисульфидную связь с легкой цепью антитела, и две тяжелые цепи антитела образуют по меньшей мере одну дисульфидную связь.

Согласно настоящему изобретению также предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело, содержащее:

a) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13;

b) вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14,

и приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

Согласно настоящему изобретению также предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело, содержащее:

a) тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21;

b) легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22,

и приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

Согласно одному варианту реализации антитело представляет собой IgG1 человека, сконструированный для уменьшения связывания антитела с гамма-рецептором Fc.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ лечения рака, включающий введение пациенту-человеку, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела, причем указанное антитело связывается с TIGIT человека (SEQ ID NO: 31) или внеклеточным доменом TIGIT человека, например, SEQ ID NO: 32, содержащего:

a) тяжелую цепь, содержащую HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; и

b) легкую цепь, содержащую LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR2, имеющую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 5, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

Согласно одному варианту реализации тяжелая цепь антитела образует по меньшей мере одну дисульфидную связь с легкой цепью антитела, и две тяжелые цепи антитела образуют по меньшей мере одну дисульфидную связь.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ лечения рака, включающий введение пациенту-человеку, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела, содержащего:

a) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; и

b) вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ лечения рака, включающий введение пациенту-человеку, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела, содержащего:

a) тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21;

b) легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22.

Согласно одному варианту реализации антитело представляет собой IgG1 человека, сконструированный для уменьшения связывания антитела с гамма-рецептором Fc.

Согласно настоящему изобретению также предложены способы лечения и способы применения.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ лечения рака, включающий введение пациенту-человеку, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела, описанного в данном документе, причем указанный рак представляет собой рак легкого, рак молочной железы, рак головы и шеи, меланому, рак печени, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак почки, рак предстательной железы, рак яичника, рак эндометрия или гепатоцеллюлярную карциному.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ лечения рака, включающий введение пациенту-человеку, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела, описанного в данном документе, причем указанный рак представляет собой немелкоклеточный рак легкого или мелкоклеточный рак легкого. Согласно настоящему изобретению дополнительно предложен способ лечения рака, включающий введение пациенту-человеку, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела, описанного в данном документе, причем указанный рак представляет собой трижды отрицательный рак молочной железы.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ лечения рака, включающий введение пациенту-человеку, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела, описанного в данном документе, причем указанное антитело вводят в комбинации с ионизирующим излучением.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ лечения рака, включающий введение пациенту-человеку, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела, описанного в данном документе, причем указанное антитело вводят в комбинации с одним или более химиотерапевтическими агентами.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ лечения рака, включающий введение пациенту-человеку, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела, описанного в данном документе, причем указанное антитело вводят в комбинации с ионизирующим излучением и одним или более химиотерапевтическими агентами.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения также предложен способ лечения рака, включающий введение эффективного количества биспецифичного антитела, раскрытого в данном документе, в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с одним или более противоопухолевыми агентами. Неограничивающие примеры противоопухолевых агентов включают рамуцирумаб, нецитумумаб, оларатумаб, гемцитабин, пеметрексед, галунисертиб, абемациклиб, цисплатин, карбоплатин, дакарбазин, липосомальный доксорубицин, доцетаксел, циклофосфамид и доксорубицин, навельбин, эрибулин, паклитаксел, частицы паклитаксела, связанные с белком, для инъекционной суспензии, иксабепилон, капецитабин, FOLFOX (лейковорин, фторурацил и оксалиплатин), FOLFIRI (лейковорин, фторурацил и иринотекан), цетуксимаб, ингибитор EGFR, ингибитор A-Raf, ингибитор B-Raf, ингибитор CDK4/6, ингибитор CDK7, ингибитор идолеамин-2,3-диоксигеназы, ингибитор TGFβ, ингибитор рецептора TGFβ, IL-10 и пегилированный IL-10 (например, пегилодекакин).

Согласно настоящему изобретению также предложено антитело для применения в лечении рака, причем указанное антитело связывается с TIGIT человека (SEQ ID NO: 31) или с внеклеточным доменом TIGIT человека, например, SEQ ID NO: 32, содержащее:

а) тяжелую цепь, содержащую HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; и

b) легкую цепь, содержащую LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

Согласно одному варианту реализации тяжелая цепь антитела образует по меньшей мере одну дисульфидную связь с легкой цепью антитела, и две тяжелые цепи антитела образуют по меньшей мере одну дисульфидную связь.

Согласно настоящему изобретению также предложено антитело для применения в лечении рака, содержащее:

a) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; и

b) вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

Согласно настоящему изобретению также предложено антитело для применения в лечении рака, содержащее:

a) тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21; и

b) легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22.

Согласно одному варианту реализации антитело представляет собой IgG1 человека, сконструированный для уменьшения связывания антитела с гамма-рецептором Fc.

Согласно настоящему изобретению также предложено антитело для применения в лечении рака, причем указанный рак представляет собой рак легкого, рак молочной железы, рак головы и шеи, меланому, рак печени, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак почки, рак предстательной железы, рак яичника, рак эндометрия или гепатоцеллюлярную карциному. Согласно настоящему изобретению дополнительно предложено антитело для применения в лечении рака легкого, причем указанный рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого или мелкоклеточный рак легкого. Согласно настоящему изобретению также предложено антитело для применения в лечении рака молочной железы, причем указанный рак молочной железы представляет собой трижды отрицательный рак молочной железы.

Согласно одному варианту реализации антитело вводят в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с ионизирующим излучением. Согласно другому варианту реализации антитело вводят в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с одним или более химиотерапевтическими агентами. Согласно другому варианту реализации антитело вводят в одновременной, раздельной или

последовательной комбинации с ионизирующим излучением и одним или более химиотерапевтическими агентами.

Согласно настоящему изобретению также предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело для применения в лечении рака, причем указанное антитело связывается с TIGIT человека (SEQ ID NO: 31) или внеклеточным доменом TIGIT человека, например, SEQ ID NO: 32, содержащее:

a) тяжелую цепь, содержащую HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; и

b) легкую цепь, содержащую LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6,

и приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

Согласно одному варианту реализации тяжелая цепь антитела образует по меньшей мере одну дисульфидную связь с легкой цепью антитела, и две тяжелые цепи антитела образуют по меньшей мере одну дисульфидную связь.

Согласно настоящему изобретению также предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело для применения в лечении рака, содержащее:

a) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; и

b) вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14,

и приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

Согласно настоящему изобретению также предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело для применения в лечении рака, содержащее:

a) тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21; и

b) легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22,

и приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

Согласно одному варианту реализации антитело представляет собой IgG1 человека, сконструированный для уменьшения связывания антитела с гамма-рецептором Fc.

Согласно настоящему изобретению также предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело для применения в лечении рака, причем указанный рак

представляет собой рак легкого, рак молочной железы, рак головы и шеи, меланому, рак печени, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак почки, рак предстательной железы, рак яичника, рак эндометрия или гепатоцеллюлярную карциному. Согласно настоящему изобретению дополнительно предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело для применения в лечении рака легкого, причем указанный рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого или мелкоклеточный рак легкого. Согласно настоящему изобретению дополнительно предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело для применения в лечении рака молочной железы, причем указанный рак молочной железы представляет собой трижды отрицательный рак молочной железы.

Согласно одному варианту реализации композицию вводят в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с ионизирующим излучением. Согласно другому варианту реализации фармацевтическую композицию вводят в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с одним или более химиотерапевтическими агентами. Согласно другому варианту реализации фармацевтическую композицию вводят в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с ионизирующим излучением и одним или более химиотерапевтическими агентами.

Согласно настоящему изобретению также предложено применение антитела согласно настоящему изобретению в изготовлении лекарственного средства для лечения рака, причем указанное антитело связывается с TIGIT человека (SEQ ID NO: 31) или с внеклеточным доменом TIGIT человека, например, SEQ ID NO: 32, содержащего:

a) тяжелую цепь, содержащую HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; и

b) легкую цепь, содержащую LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

Согласно одному варианту реализации тяжелая цепь антитела образует по меньшей мере одну дисульфидную связь с легкой цепью антитела, и две тяжелые цепи антитела образуют по меньшей мере одну дисульфидную связь.

Согласно настоящему изобретению также предложено применение антитела согласно настоящему изобретению в изготовлении лекарственного средства для лечения рака, содержащего:

a) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; и

b) вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

Согласно настоящему изобретению также предложено применение антитела согласно настоящему изобретению в изготовлении лекарственного средства для лечения рака, содержащего:

a) тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21; и

b) легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22.

Согласно одному варианту реализации антитело представляет собой IgG1 человека, сконструированный для уменьшения связывания антитела с гамма-рецептором Fc.

Согласно настоящему изобретению также предложено применение антитела согласно настоящему изобретению в изготовлении лекарственного средства для лечения рака, причем указанный рак представляет собой рак легкого, рак молочной железы, рак головы и шеи, меланому, рак печени, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак почки, рак предстательной железы, рак яичника, рак эндометрия или гепатоцеллюлярную карциному. Согласно настоящему изобретению дополнительно предложено применение антитела согласно настоящему изобретению в изготовлении лекарственного средства для лечения рака легкого, причем указанный рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого или мелкоклеточный рак легкого. Согласно настоящему изобретению дополнительно предложено применение антитела согласно настоящему изобретению в изготовлении лекарственного средства для лечения рака молочной железы, причем указанный рак молочной железы представляет собой трижды отрицательный рак молочной железы.

Согласно одному варианту реализации антитело вводят в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с ионизирующим излучением. Согласно другому варианту реализации антитело вводят в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с одним или более химиотерапевтическими агентами. Согласно другому варианту реализации антитело вводят в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с ионизирующим излучением и одним или более химиотерапевтическими агентами.

В вариантах реализации, которые относятся к способу лечения, как описано в данном документе, такие варианты реализации также являются дополнительными вариантами реализации для применения в таком лечении или, альтернативно, для применения в изготовлении лекарственного средства для применения в таком лечении.

Неограничивающие примеры полезных химиотерапевтических агентов включают 5-фторурацил, гидроксимочевину, гемцитабин, пеметрексед, метотрексат, доксорубицин, этопозид, карбоплатин, цисплатин, циклофосфамид, мелфалан, дакарбазин, таксол, камптотецин, FOLFIRI, FOLFOX, доцетаксел, даунорубицин, паклитаксел, оксалиплатин и их комбинации.

Антитела согласно настоящему изобретению или фармацевтические композиции, содержащие их, могут быть введены парентеральными путями, неограничивающий пример которых представляет собой внутривенное введение. Антитела согласно настоящему изобретению могут быть введены пациенту-человеку отдельно с фармацевтически приемлемыми носителями, разбавителями или вспомогательными веществами в виде однократной или многократных доз. Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может быть приготовлена с помощью способов, известных в данной области техники (например, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 22nd ed. (2012), A. Loyd et al., Pharmaceutical Press).

Согласно одному варианту реализации полипептидная молекула согласно настоящему изобретению является стерильной. Согласно другому варианту реализации полипептидная молекула согласно настоящему изобретению является по существу чистой. Согласно другому варианту реализации полипептидная молекула согласно настоящему изобретению является по существу чистой и стерильной.

Биспецифичные антитела согласно настоящему изобретению являются гетеродимерными в том смысле, что каждое плечо антитела проявляет селективное моновалентное связывание со своим когнатным антигеном благодаря, помимо прочего, наличию двух разных тяжелых цепей и двух разных легких цепей. В настоящем изобретении одно плечо биспецифичного антитела связывает PD-1 человека (SEQ ID NO: 29) или внеклеточный домен PD-1 человека (ВКД), например, продукт экспрессии ВКД-His (SEQ ID NO: 30), в то время как другое плечо связывает TIGIT человека (SEQ ID NO: 31) или ВКД TIGIT, например, продукт экспрессии ВКД-His (SEQ ID NO: 32). Согласно предпочтительному варианту реализации одно плечо антитела оказывает антагонистическое действие на PD-1 человека (SEQ ID NO: 29), а другое плечо оказывает антагонистическое действие на TIGIT человека (SEQ ID NO: 31).

Согласно настоящему изобретению также предложено антитело, которое связывается с PD-1 человека (SEQ ID NO: 29) или с внеклеточным доменом PD-1, например, SEQ ID NO: 30, и связывается с TIGIT человека (SEQ ID NO: 31) или с внеклеточным доменом TIGIT, например, SEQ ID NO: 32, содержащее:

a) первую тяжелую цепь, содержащую HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3;

b) первую легкую цепь, содержащую LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6;

c) вторую тяжелую цепь, содержащую HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9; и

d) вторую легкую цепь, содержащую LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

Согласно настоящему изобретению также предложено антитело, содержащее:

a) вариабельную область первой тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13;

b) вариабельную область первой легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14,

c) вариабельную область второй тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17; и

d) вариабельную область второй легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

Согласно настоящему изобретению также предложено антитело, содержащее:

a) первую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21;

b) первую легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22;

c) вторую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; и

d) вторую легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24.

Согласно настоящему изобретению также предложено антитело (называемое в данном документе Антителом A), имеющее:

a) первую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21;

b) первую легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22;

c) вторую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; и

d) вторую легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24.

Согласно одному варианту реализации первая тяжелая цепь антитела образует по меньшей мере одну дисульфидную связь с первой легкой цепью антитела, вторая тяжелая цепь антитела образует по меньшей мере одну дисульфидную связь со второй легкой цепью антитела и первая тяжелая цепь антитела образует по меньшей мере одну дисульфидную связь со второй тяжелой цепью антитела.

Согласно другому варианту реализации антитело представляет собой IgG1 человека, сконструированный для уменьшения связывания антитела с гамма-рецептором Fc.

Согласно настоящему изобретению также предложена молекула ДНК, содержащая полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере один полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24. Согласно предпочтительному варианту реализации молекула ДНК содержит полинуклеотид, содержащий по меньшей мере одну из SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 28.

Согласно настоящему изобретению также предложена клетка млекопитающего, содержащая молекулу ДНК, содержащую полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере один полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23 и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ получения антитела, включающий культивирование клетки млекопитающего, способной экспрессировать антитело, и выделение антитела, содержащего:

a) первую тяжелую цепь, содержащую HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3;

b) первую легкую цепь, содержащую LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6;

c) вторую тяжелую цепь, содержащую HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9; и

d) вторую легкую цепь, содержащую LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

Согласно одному варианту реализации первая тяжелая цепь антитела образует по меньшей мере одну дисульфидную связь с первой легкой цепью антитела, вторая тяжелая цепь антитела образует по меньшей мере одну дисульфидную связь со второй легкой цепью антитела и первая тяжелая цепь антитела образует по меньшей мере одну дисульфидную связь со второй тяжелой цепью антитела.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ получения антитела, включающий культивирование клетки млекопитающего, способной экспрессировать антитело, и выделение антитела, содержащего:

a) вариабельную область первой тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13;

b) вариабельную область первой легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14;

c) вариабельную область второй тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17; и

d) вариабельную область второй легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ получения антитела, включающий культивирование клетки млекопитающего, способной экспрессировать антитело, и выделение антитела, содержащего:

a) первую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21;

b) первую легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22;

c) вторую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; и

d) вторую легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ получения антитела, включающий культивирование клетки млекопитающего, способной экспрессировать антитело, и выделение антитела; причем указанное антитело представляет собой IgG1 человека, сконструированный для уменьшения связывания указанного антитела с гамма-рецептором Fc.

Согласно настоящему изобретению также предложено антитело, полученное с помощью способа, включающего культивирование клетки млекопитающего, способной экспрессировать антитело, и выделение антитела, причем указанное антитело содержит:

a) первую тяжелую цепь, содержащую HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3;

b) первую легкую цепь, содержащую LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6;

c) вторую тяжелую цепь, содержащую HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9; и

d) вторую легкую цепь, содержащую LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

Согласно одному варианту реализации первая тяжелая цепь антитела образует по меньшей мере одну дисульфидную связь с первой легкой цепью антитела, вторая тяжелая цепь антитела образует по меньшей мере одну дисульфидную связь со второй легкой цепью антитела и первая тяжелая цепь антитела образует по меньшей мере одну дисульфидную связь со второй тяжелой цепью антитела.

Согласно настоящему изобретению также предложено антитело, полученное с помощью способа, включающего культивирование клетки млекопитающего, способной экспрессировать антитело, и выделение антитела, содержащего:

a) вариабельную область первой тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13;
b) вариабельную область первой легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14;
c) вариабельную область второй тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17; и
d) вариабельную область второй легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

Согласно настоящему изобретению также предложено антитело, полученное с помощью способа, включающего культивирование клетки млекопитающего, способной экспрессировать антитело, и выделение антитела, содержащего:

a) первую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21;
b) первую легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22;
c) вторую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; и
d) вторую легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24.

Согласно настоящему изобретению также предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело, причем указанное антитело связывается с PD-1 человека (SEQ ID NO: 29) или с внеклеточным доменом PD-1 человека, например, SEQ ID NO: 30, и связывается с TIGIT человека (SEQ ID NO: 31) или с внеклеточным доменом TIGIT человека, например, SEQ ID NO: 32, содержащее:

a) первую тяжелую цепь, содержащую HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, HCDR2, имеющую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 2, и HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3;

b) первую легкую цепь, содержащую LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6;

c) вторую тяжелую цепь, содержащую HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9; и

d) вторую легкую цепь, содержащую LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12,

и приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

Согласно одному варианту реализации первая тяжелая цепь антитела образует по меньшей мере одну дисульфидную связь с первой легкой цепью антитела, вторая тяжелая цепь антитела образует по меньшей мере одну дисульфидную связь со второй легкой цепью антитела и первая тяжелая цепь антитела образует по меньшей мере одну дисульфидную связь со второй тяжелой цепью антитела.

Согласно настоящему изобретению также предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело, содержащее:

a) вариабельную область первой тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13;

b) вариабельную область первой легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14;

c) вариабельную область второй тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17; и

d) вариабельную область второй легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18,

и приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

Согласно настоящему изобретению также предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело, содержащее:

a) первую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21;

b) первую легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22;

c) вторую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; и

d) вторую легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24,

и приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

Согласно одному варианту реализации антитело представляет собой IgG1 человека, сконструированный для уменьшения связывания антитела с гамма-рецептором Fc.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ лечения рака, включающий введение пациенту-человеку, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела, причем указанное антитело связывается с PD-1 человека (SEQ ID NO: 29) или внеклеточным доменом PD-1 человека, например, SEQ ID NO: 30, и связывается с TIGIT человека (SEQ ID NO: 31) или внеклеточным доменом TIGIT человека, например, SEQ ID NO: 32, содержащего:

a) первую тяжелую цепь, содержащую HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3;

b) первую легкую цепь, содержащую LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6;

c) вторую тяжелую цепь, содержащую HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9; и

d) вторую легкую цепь, содержащую LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

Согласно одному варианту реализации первая тяжелая цепь антитела образует по меньшей мере одну дисульфидную связь с первой легкой цепью антитела, вторая тяжелая цепь антитела образует по меньшей мере одну дисульфидную связь со второй легкой

цепью антитела и первая тяжелая цепь антитела образует по меньшей мере одну дисульфидную связь со второй тяжелой цепью антитела.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ лечения рака, включающий введение пациенту-человеку, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела, содержащего:

a) вариабельную область первой тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13;

b) вариабельную область первой легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14;

c) вариабельную область второй тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17; и

d) вариабельную область второй легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ лечения рака, включающий введение пациенту-человеку, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела, содержащего:

a) первую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21;

b) первую легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22;

c) вторую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; и

d) вторую легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24.

Согласно настоящему изобретению также предложены способы лечения и способы применения.

Согласно одному варианту реализации антитело представляет собой IgG1 человека, сконструированный для уменьшения связывания антитела с гамма-рецептором Fc.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ лечения рака, включающий введение пациенту-человеку, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела, описанного в данном документе, причем указанный рак представляет собой рак легкого, рак молочной железы, рак головы и шеи, меланому, рак печени, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак почки, рак предстательной железы, рак яичника, рак эндометрия или гепатоцеллюлярную карциному.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ лечения рака, включающий введение пациенту-человеку, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела, описанного в данном документе, причем указанный рак представляет собой немелкоклеточный рак легкого или мелкоклеточный рак легкого. Согласно настоящему изобретению дополнительно предложен способ лечения рака, включающий введение пациенту-человеку, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела, описанного в данном документе, причем указанный рак представляет собой трижды отрицательный рак молочной железы.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ лечения рака, включающий введение пациенту-человеку, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела, описанного в данном документе, причем указанное антитело вводят в комбинации с ионизирующим излучением.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ лечения рака, включающий введение пациенту-человеку, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела, описанного в данном документе, причем указанное антитело вводят в комбинации с одним или более химиотерапевтическими агентами.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ лечения рака, включающий введение пациенту-человеку, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела, описанного в данном документе, причем указанное антитело вводят в комбинации с ионизирующим излучением и одним или более химиотерапевтическими агентами.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения также предложен способ лечения рака, включающий введение эффективного количества биспецифичного антитела, раскрытого в данном документе, в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с одним или более противоопухолевыми агентами. Неограничивающие примеры противоопухолевых агентов включают рамуцирумаб, нецитумумаб, оларатумаб, гемцитабин, пеметрексед, галунисертиб, абемациклиб, цисплатин, карбоплатин, дакарбазин, липосомальный доксорубицин, доцетаксел, циклофосфамид и доксорубицин, навельбин, эрибулин, паклитаксел, частицы паклитаксела, связанные с белком, для инъекционной суспензии, иксабепилон, капецитабин, FOLFOX (лейковорин, фторурацил и оксалиплатин), FOLFIRI (лейковорин, фторурацил и иринотекан), цетуксимаб, ингибитор EGFR, ингибитор A-Raf, ингибитор B-Raf, ингибитор CDK4/6, ингибитор CDK7, ингибитор идолеамин-2,3-диоксигеназы, ингибитор TGFβ, ингибитор рецептора TGFβ, IL-10 и пегилированный IL-10 (например, пегилодекакин).

Согласно настоящему изобретению также предложено антитело для применения в лечении рака, причем указанное антитело связывается с PD-1 человека (SEQ ID NO: 29) или с внеклеточным доменом PD-1 человека, например, SEQ ID NO: 30, и связывается с TIGIT человека (SEQ ID NO: 31) или с внеклеточном доменом TIGIT человека, например, SEQ ID NO: 32, содержащее:

a) первую тяжелую цепь, содержащую HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3;

b) первую легкую цепь, содержащую LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6;

c) вторую тяжелую цепь, содержащую HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9; и

d) вторую легкую цепь, содержащую LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

Согласно одному варианту реализации первая тяжелая цепь антитела образует по меньшей мере одну дисульфидную связь с первой легкой цепью антитела, вторая тяжелая цепь антитела образует по меньшей мере одну дисульфидную связь со второй легкой цепью антитела и первая тяжелая цепь антитела образует по меньшей мере одну дисульфидную связь со второй тяжелой цепью антитела.

Согласно настоящему изобретению также предложено антитело для применения в лечении рака, содержащее:

a) вариабельную область первой тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13;

b) вариабельную область первой легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14;

c) вариабельную область второй тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17; и

d) вариабельную область второй легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

Согласно настоящему изобретению также предложено антитело для применения в лечении рака, содержащее:

a) первую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21;

b) первую легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22;

c) вторую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; и

d) вторую легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24.

Согласно одному варианту реализации антитело представляет собой IgG1 человека, сконструированный для уменьшения связывания антитела с гамма-рецептором Fc.

Согласно настоящему изобретению также предложено антитело для применения в лечении рака, причем указанный рак представляет собой рак легкого, рак молочной железы, рак головы и шеи, меланому, рак печени, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак почки, рак предстательной железы, рак яичника, рак эндометрия или гепатоцеллюлярную карциному. Согласно настоящему изобретению дополнительно предложено антитело для применения в лечении рака легкого, причем указанный рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого или мелкоклеточный рак легкого. Согласно настоящему изобретению также предложено антитело для применения в лечении рака молочной железы, причем указанный рак молочной железы представляет собой трижды отрицательный рак молочной железы.

Согласно одному варианту реализации антитело вводят в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с ионизирующим излучением. Согласно другому варианту реализации антитело вводят в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с одним или более химиотерапевтическими агентами. Согласно другому варианту реализации антитело вводят в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с ионизирующим излучением и одним или более химиотерапевтическими агентами.

Согласно настоящему изобретению также предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело для применения в лечении рака, причем указанное антитело связывается с PD-1 человека (SEQ ID NO: 29) или внеклеточным доменом PD-1

человека, например, SEQ ID NO: 30, и связывается с TIGIT человека (SEQ ID NO: 31) или внеклеточным доменом TIGIT человека, например, SEQ ID NO: 32, содержащее:

a) первую тяжелую цепь, содержащую HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3;

b) первую легкую цепь, содержащую LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6;

c) вторую тяжелую цепь, содержащую HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9; и

d) вторую легкую цепь, содержащую LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12,

и приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

Согласно одному варианту реализации первая тяжелая цепь антитела образует по меньшей мере одну дисульфидную связь с первой легкой цепью антитела, вторая тяжелая цепь антитела образует по меньшей мере одну дисульфидную связь со второй легкой цепью антитела и первая тяжелая цепь антитела образует по меньшей мере одну дисульфидную связь со второй тяжелой цепью антитела.

Согласно настоящему изобретению также предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело для применения в лечении рака, содержащее:

a) вариабельную область первой тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13;

b) вариабельную область первой легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14;

c) вариабельную область второй тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17; и

d) вариабельную область второй легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18,

и приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

Согласно настоящему изобретению также предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело для применения в лечении рака, содержащее:

a) первую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21;

b) первую легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22;

c) вторую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; и

d) вторую легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24,

и приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

Согласно одному варианту реализации антитело представляет собой IgG1 человека, сконструированный для уменьшения связывания антитела с гамма-рецептором Fc.

Согласно настоящему изобретению также предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело для применения в лечении рака, причем указанный рак представляет собой рак легкого, рак молочной железы, рак головы и шеи, меланому, рак печени, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак почки, рак предстательной железы, рак яичника, рак эндометрия или гепатоцеллюлярную карциному. Согласно настоящему изобретению дополнительно предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело для применения в лечении рака легкого, причем указанный рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого или мелкоклеточный рак легкого. Согласно настоящему изобретению дополнительно предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело для применения в лечении рака молочной железы, причем указанный рак молочной железы представляет собой трижды отрицательный рак молочной железы.

Согласно одному варианту реализации композицию вводят в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с ионизирующим излучением. Согласно другому варианту реализации фармацевтическую композицию вводят в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с одним или более химиотерапевтическими агентами. Согласно другому варианту реализации фармацевтическую композицию вводят в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с ионизирующим излучением и одним или более химиотерапевтическими агентами.

Согласно настоящему изобретению также предложено применение антитела согласно настоящему изобретению в изготовлении лекарственного средства для лечения

рака, причем указанное антитело связывается с PD-1 человека (SEQ ID NO: 29) или с внеклеточным доменом PD-1 человека, например, SEQ ID NO: 30, и связывается с TIGIT человека (SEQ ID NO: 31) или с внеклеточным доменом TIGIT человека, например, SEQ ID NO: 32, содержащего:

a) первую тяжелую цепь, содержащую HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3;

b) первую легкую цепь, содержащую LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6;

c) вторую тяжелую цепь, содержащую HCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, HCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и HCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9; и

d) вторую легкую цепь, содержащую LCDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, LCDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и LCDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

Согласно одному варианту реализации первая тяжелая цепь антитела образует по меньшей мере одну дисульфидную связь с первой легкой цепью антитела, вторая тяжелая цепь антитела образует по меньшей мере одну дисульфидную связь со второй легкой цепью антитела и первая тяжелая цепь антитела образует по меньшей мере одну дисульфидную связь со второй тяжелой цепью антитела.

Согласно настоящему изобретению также предложено применение антитела согласно настоящему изобретению в изготовлении лекарственного средства для лечения рака, содержащего:

a) вариабельную область первой тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13;

b) вариабельную область первой легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14;

c) вариабельную область второй тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17; и

d) вариабельную область второй легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

Согласно настоящему изобретению также предложено применение антитела согласно настоящему изобретению в изготовлении лекарственного средства для лечения рака, содержащего:

a) первую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21;

b) первую легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22;

c) вторую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; и

d) вторую легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24.

Согласно одному варианту реализации антитело представляет собой IgG1 человека, сконструированный для уменьшения связывания антитела с гамма-рецептором Fc.

Согласно настоящему изобретению также предложено применение антитела согласно настоящему изобретению в изготовлении лекарственного средства для лечения рака, причем указанный рак представляет собой рак легкого, рак молочной железы, рак головы и шеи, меланому, рак печени, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак почки, рак предстательной железы, рак яичника, рак эндометрия или гепатоцеллюлярную карциному. Согласно настоящему изобретению дополнительно предложено применение антитела согласно настоящему изобретению в изготовлении лекарственного средства для лечения рака легкого, причем указанный рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого или мелкоклеточный рак легкого. Согласно настоящему изобретению дополнительно предложено применение антитела согласно настоящему изобретению в изготовлении лекарственного средства для лечения рака молочной железы, причем указанный рак молочной железы представляет собой трижды отрицательный рак молочной железы.

Согласно одному варианту реализации антитело вводят в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с ионизирующим излучением. Согласно другому варианту реализации антитело вводят в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с одним или более химиотерапевтическими агентами. Согласно другому варианту реализации антитело вводят в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с ионизирующим излучением и одним или более химиотерапевтическими агентами.

В вариантах реализации, которые относятся к способу лечения, как описано в данном документе, такие варианты реализации также являются дополнительными вариантами реализации для применения в таком лечении или, альтернативно, для применения в изготовлении лекарственного средства для применения в таком лечении.

Неограничивающие примеры полезных химиотерапевтических агентов включают 5-фторурацил, гидроксимочевину, гемцитабин, пеметрексед, метотрексат, доксорубицин, этопозид, карбоплатин, цисплатин, циклофосфамид, мелфалан, дакарбазин, таксол, камптотецин, FOLFIRI, FOLFOX, доцетаксел, даунорубицин, паклитаксел, оксалиплатин и их комбинации.

Антитела согласно настоящему изобретению или фармацевтические композиции, содержащие их, могут быть введены парентеральными путями, неограничивающий пример которых представляет собой внутривенное введение. Антитела согласно настоящему изобретению могут быть введены пациенту-человеку отдельно с фармацевтически приемлемыми носителями, разбавителями или вспомогательными веществами в виде однократной или многократных доз. Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может быть приготовлена с помощью способов, известных в данной области техники (например, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 22nd ed. (2012), A. Loyd et al., Pharmaceutical Press).

Согласно одному варианту реализации полипептидная молекула согласно настоящему изобретению является стерильной. Согласно другому варианту реализации полипептидная молекула согласно настоящему изобретению является по существу чистой. Согласно другому варианту реализации полипептидная молекула согласно настоящему изобретению является по существу чистой и стерильной.

Схемы дозирования для введения полипептидной молекулы согласно настоящему изобретению могут быть скорректированы для обеспечения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического эффекта).

Согласно одному варианту реализации, когда полипептидная молекула согласно настоящему изобретению связывается с TIGIT человека или, она оказывает антагонистическое действие на TIGIT человека. Согласно другому варианту реализации, когда полипептидная молекула согласно настоящему изобретению связывается с PD-1 человека, она оказывает антагонистическое действие на PD-1 человека. В данном документе термин «оказывать антагонистическое действие» относится к действию блокирования, прерывания, подавления, ингибирования или снижения биологической активности, представляющей интерес. В этом отношении полипептидные молекулы, например, антитела, согласно настоящему изобретению оказывают антагонистическое

действие на PD-1 человека, связываясь с PD-1 человека и блокируя связывание PD-L1 человека с PD-1 человека, и оказывают антагонистическое действие на TIGIT человека, связываясь с TIGIT человека и блокируя связывание TIGIT человека с CD155 и/или с CD112.

В данном документе термин «антитело» относится к мономерной или димерной молекуле иммуноглобулина, имеющей тяжелую цепь и легкую цепь, которая распознает и связывается с мишенью, такой как белок, пептид или полипептид. Согласно одному варианту реализации антитело специфично связывается с мишенью. Каждая тяжелая цепь состоит из N-концевой HCVR (вариабельной области тяжелой цепи) и HCCR (константной области тяжелой цепи). Каждая легкая цепь состоит из N-концевой LCVR (вариабельной области легкой цепи) и LCCR (константной области легкой цепи). Константная область тяжелых цепей содержит домены CH1, CH2 и CH3.

Термин «фрагмент антитела» означает фрагмент антитела, который сохраняет способность связываться с мишенью, с которой связывается интактное антитело. Согласно одному варианту реализации фрагмент антитела специфично связывается с мишенью. Согласно другому варианту реализации фрагмент антитела содержит HCDR 1-3 и LCDR 1-3 интактного антитела. Согласно другому варианту реализации фрагмент антитела содержит HCVR и LCVR интактного антитела.

Если в данном документе не указано иное, «TIGIT» относится к TIGIT человека, и «PD-1» относится к PD-1 человека.

В данном документе термин «связывает» относится к молекулярному взаимодействию между двумя молекулами, например, полипептидной молекулой согласно настоящему изобретению и TIGIT, PD-1 или TIGIT и PD-1. Термин «моноспецифичное связывание» относится к связыванию с одной мишенью, например, TIGIT человека или PD-1 человека. Термин «биспецифичное связывание» относится к связыванию с TIGIT человека и с PD-1 человека. Термин «полиспецифичное связывание» относится к связыванию с TIGIT человека, PD-1 человека и одной или двумя другими мишенями.

Термины «селективно связывается» или «специфично связывается» означают, что полипептидная молекула согласно настоящему изобретению взаимодействует чаще, быстрее, с большей продолжительностью, с большей аффинностью или с некоторой комбинацией вышеперечисленного с TIGIT человека или с PD-1 или с TIGIT человека и PD-1 человека, чем другие вещества. Согласно одному варианту реализации «специфично связывается» означает, что полипептидная молекула согласно настоящему изобретению связывается с TIGIT человека или с PD-1 человека, или с TIGIT человека и PD-1 человека

с K_D примерно 0,1 мМ или менее. Согласно другому варианту реализации «специфично связывается» означает, что полипептидная молекула согласно настоящему изобретению связывается с TIGIT человека или с PD-1 человека, или с TIGIT человека и PD-1 человека с K_D примерно 0,01 мМ или менее. Согласно другому варианту реализации «специфично связывается» означает, что полипептидная молекула согласно настоящему изобретению связывается с TIGIT человека или с PD-1 человека, или с TIGIT человека и PD-1 человека с K_D примерно 0,001 мМ или менее. Согласно другому варианту реализации «специфично связывается» означает, что полипептидная молекула согласно настоящему изобретению связывается с TIGIT человека или с PD-1 человека, или с TIGIT человека и PD-1 человека с K_D примерно 0,0001 мМ или менее. Согласно другому варианту реализации полипептидная молекула согласно настоящему изобретению связывается с TIGIT человека с K_D, которая отличается от K_D, с которой полипептидная молекула связывается с PD-1 человека. Согласно другому варианту реализации полипептидная молекула связывается с TIGIT человека примерно в 10 раз сильнее, чем она связывается с PD-1 человека.

Согласно одному варианту реализации термин «полипептидная молекула», используемый в контексте данного документа, относится к молекуле, которая содержит полимер из аминокислотных остатков. Согласно другому варианту реализации полипептидная молекула состоит из полимера из аминокислотных остатков.

Согласно одному варианту реализации полипептидная молекула представляет собой молекулу scFv, которая связывается с TIGIT человека или с PD-1 человека, или с TIGIT человека и PD-1 человека. Согласно другому варианту реализации молекула scFv специфично связывается с TIGIT человека или с PD-1 человека, или с TIGIT человека и PD-1 человека. Молекула scFv может быть моноспецифичной (связывается с TIGIT человека или с PD-1 человека), биспецифичной (связывается с TIGIT человека и с PD-1 человека) или полиспецифичной (связывается с PD-1 человека, TIGIT человека и/или другой мишенью).

Согласно одному варианту реализации полипептидная молекула представляет собой антитело, которое связывается с TIGIT человека или с PD-1 человека, или с TIGIT человека и PD-1 человека. Согласно другому варианту реализации антитело специфично связывается с TIGIT человека или с PD-1 человека, или с TIGIT человека и PD-1 человека. Антитело может быть моноспецифичным (связывается с TIGIT человека или PD-1 человека), биспецифичным (связывается с TIGIT человека и PD-1 человека) или полиспецифичным (связывается с PD-1 человека, TIGIT человека и с одной или двумя другими мишенями).

Согласно одному варианту реализации полипептидная молекула представляет собой фрагмент антитела, который связывается с TIGIT человека или с PD-1 человека, или с TIGIT человека и PD-1 человека. Согласно другому варианту реализации фрагмент антитела специфично связывается с TIGIT человека или с PD-1 человека, или с TIGIT человека и PD-1 человека. Фрагмент антитела может быть моноспецифичным (связывается с TIGIT человека или PD-1 человека), биспецифичным (связывается с TIGIT человека и PD-1 человека) или полиспецифичным (связывается с PD-1 человека, TIGIT человека и с одной или двумя другими мишенями).

В данном документе термин «по существу чистый» относится к материалу, например, полипептидной молекуле согласно настоящему изобретению, которая по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% свободна от примесей.

Синонимами «TIGIT» являются WUCAM, Vstm3 и VSIG9.

Синонимами «CD155» являются рецептор полиовируса, PVR, Necl-5, NECL5, Tage4, HVED и PVS.

Синонимами «CD112» являются молекула клеточной адгезии нектин 2, нектин-2, NECTIN2, PRR-2, PVRL2, PVRR2 и HVEB.

Синонимами «CD226» являются вспомогательная молекула DNAX-1, DNAM-1, DNAM1, PTA1 и TLiSA1.

Термин «процесс лечения» (или «лечить», или «лечение») относится к замедлению, прерыванию, приостановке, облегчению, прекращению, уменьшению или обращению вспять прогрессирования или тяжести существующего симптома, нарушения, патологии или заболевания.

Термин «эффективное количество» означает количество полипептидной молекулы согласно настоящему изобретению или фармацевтической композиции, содержащей антитело согласно настоящему изобретению, которое вызывает биологический или медицинский ответ или целевой терапевтический эффект в ткани, системе, организме животного, млекопитающего или человека, который предполагается исследователем, врачом или другим медицинским работником. Эффективное количество полипептидной молекулы может изменяться в зависимости от таких факторов как состояние заболевания, возраст, пол и масса индивидуума, и способности полипептидной молекулы вызывать целевой ответ у индивидуума. Эффективное количество также является таким, при котором любой токсический или вредный эффект антитела перевешивается терапевтически благоприятными эффектами.

Выделенная молекула ДНК, кодирующая область HCVR, может быть преобразована в полноразмерный ген тяжелой цепи путем функционального соединения ДНК, кодирующей HCVR, с другой молекулой ДНК, кодирующей константные области тяжелой цепи. Последовательности генов константной области тяжелой цепи человека, а также других млекопитающих, известны в данной области техники. Фрагменты ДНК, охватывающие эти области, могут быть получены, например, с помощью стандартной ПЦР-амплификации.

Выделенная молекула ДНК, кодирующая область LCVR, может быть преобразована в полноразмерный ген легкой цепи путем функционального соединения ДНК, кодирующей LCVR, с другой молекулой ДНК, кодирующей константную область легкой цепи. Последовательности генов константной области легкой цепи человека, а также других млекопитающих, известны в данной области техники. Фрагменты ДНК, охватывающие эти области, могут быть получены, например, с помощью стандартной ПЦР-амплификации.

В данном документе термин «CDR» относится к области, определяющей комплементарность, антитела, термин «HCDR» относится к CDR тяжелой цепи антитела, и термин «LCDR» относится к CDR легкой цепи антитела. Для целей настоящего изобретения используют определения CDR Норта. Определение CDR Норта (North *et al.*, "A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations", Journal of Molecular Biology, 406, 228-256 (2011)) основано на кластеризации распределения аффинности с помощью большого количества кристаллических структур.

В данном документе термин «модифицированный IgG1 человека» означает IgG1 человека, сконструированный для уменьшения связывания IgG1 человека по меньшей мере с одним гамма-рецептором Fc человека. Как правило, это выполняется путем мутирования остатков, которые приводят к уменьшению связывания антитела с гамма-рецептором (ами) Fc, например, мутации P329A, L234A и L235A.

Термин «солидная опухоль» относится к опухоли в ткани, которая не является кровью, лимфатическими сосудами или костным мозгом.

Способы анализа активности TIGIT *in vitro* известны обычным специалистам в данной области техники, например, в He et al., *Cancer Res 2017*; 77: 6375-6388; Yu et al., *Nature Immunology 2009*; 10(1): 48-57; Johnston et al., *Cancer Cell 2014*; 26: 923–937; Stanietskya, et al., *PNAS 2009*; 106(42): 17858–17863; Lozano et al., *J Immunol. 2012*; 188(8): 3869–3875.

Способы анализа активности PD-1 *in vitro* известны обычным специалистам в данной области техники, например, в Carpenito et al., *J Immunother Cancer 2018*; 6(1):31;

Ghosh et al., *Mol Cancer Ther. 2019*;18(3):632-641; Stewart et al., *Cancer Immunol Res. 2015*; 3(9):1052-62; Maute et al., *PNAS 2015*; 112(47): E6506-14.

Модели солидной опухоли на мышах *in vivo* хорошо известны обычным специалистам в данной области техники, как показано в данном документе и как раскрыто, например, в Sanmamed MF, *et al.*, *Ann Oncol. 2016*; 27: 1190-1198; Manning HC *et al.*, *J. Nucl. Med 2016*; 57(Suppl. 1): 60S-68S; Teich BA. *Cancer Ther. 2006*; 5: 2435; Rongvaux A, *et al.*, *Ann. Rev. Immunol. 2013*; 31: 635-74; Stylli SS *et al.*, *J. Clin. Neurosci 2015*; 619-26; Oh T, *et al.*, *J. Transl. Med. 2014*; 12: 107-117; Newcomb, EW, *et al.*, *Radiation Res. 2010*; 173: 426-432; Song Y, *et al.*, *Proc Natl. Acad. Sci. USA 2013*; 110:17933-8; и Rutter EM, *et al.*, *Scientific Reports 2017*; 7: DOI:10.1038/s41598-017-02462-0.

Молекула ДНК согласно настоящему изобретению представляет собой молекулу ДНК, которая содержит не встречающуюся в природе полинуклеотидную последовательность, которая кодирует полипептид, имеющий аминокислотную последовательность по меньшей мере одного из полипептидов в антителе согласно настоящему изобретению.

Полинуклеотиды согласно настоящему изобретению экспрессироваться в клетке-хозяине после функционального соединения последовательностей с последовательностью контроля экспрессии. Векторы экспрессии, как правило, реплицируются в организмах-хозяевах либо как эписомы, либо как неотъемлемая часть хромосомной ДНК хозяина. Обычно векторы экспрессии содержат селективные маркеры, например, тетрациклин, неомицин и дигидрофолатредуктазу, чтобы обеспечить детектирование тех клеток, которые трансформированы целевыми последовательностями ДНК.

Вектор экспрессии, содержащий представляющие интерес полинуклеотидные последовательности (например, полинуклеотиды, кодирующие полипептиды полипептидной молекулы и последовательности контроля экспрессии), может быть перенесен в клетку-хозяина с помощью известных способов, которые изменяются в зависимости от типа клеток-хозяев.

Полипептидная молекула согласно настоящему изобретению может быть легко получена в клетках-хозяевах млекопитающих, неограничивающие примеры которых включают клетки CHO, NS0, HEK293 или COS. Клетки-хозяева можно культивировать с использованием методик, известных в данной области техники.

Для очистки антитела согласно настоящему изобретению можно применять различные способы очистки белков, и такие способы известны в данной области техники и описаны, например, в Deutscher, *Methods in Enzymology* 182: 83-89 (1990) и Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, 3rd Edition, Springer, NY (1994).

Последовательности, упомянутые в данном документе, нумеруются в соответствии с номерами идентификаторов последовательностей, перечисленными в Таблице 1.

Таблица 1. Номера идентификаторов последовательностей

	Плечо против TIGIT человека	Плечо против PD-1 человека
HCDR1	1	7
HCDR2	2	8
HCDR3	3	9
LCDR1	4	10
LCDR2	5	11
LCDR3	6	12
HCVR	13	17
LCVR	14	18
HCCR	15	19
LCCR	16	20
Тяжелая цепь	21	23
Легкая цепь	22	24
ДНК тяжелой цепи	25	27
ДНК легкой цепи	26	28
PD-1 человека	29	
ВКД-His PD-1 человека	30	
TIGIT человека	31	
ВКД-His TIGIT человека	32	

HCCR: константная область тяжелой цепи; LCCR: константная область легкой цепи; HCVR: вариабельная область тяжелой цепи; LCVR: вариабельная область легкой цепи; ВКД: внеклеточный домен

Примеры

Экспрессия и очистка Антитела А

Антитела согласно настоящему изобретению могут быть экспрессированы и очищены по существу, как описано далее. Соответствующая клетка-хозяин, такая как HEK 293 или CHO, может быть временно или стабильно трансфицирована экспрессионной системой для секреции антител, используя оптимальное предварительно определенное соотношение векторов тяжелая цепь:легкая цепь или единую векторную систему, кодирующую как тяжелую цепь, так и легкую цепь. Антитело А согласно настоящему изобретению может быть временно или стабильно трансфицировано с

использованием экспрессионной системы для секреции антител с использованием одной или более молекул ДНК, кодирующих первую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, первую легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, вторую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, и вторую легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24.

Антитела могут быть очищены с использованием одной из многих обычно используемых методик. Например, в целях удобства среда может быть нанесена на колонку MabSelect (GE Healthcare) или колонку KappaSelect (GE Healthcare), уравновешенную совместимым буфером, таким как забуференный фосфатами физиологический раствор (pH 7,4). Колонка может быть промыта для удаления неспецифических связывающих компонентов. Связанное антитело можно элюировать, например, градиентом pH (например, от 20 мМ Трис-буфера, pH 7,0, до 10 мМ буфера на основе цитрата натрия, pH 3,0, или от фосфатно-солевого буфера, pH 7,4, до 100 мМ глицинового буфера, pH 3,0). Детектирование фракций антител может быть проведено, например, с помощью УФ-поглощения или электрофореза в ДСН-ПААГ, и затем проведено их объединение. Дополнительная очистка является необязательной и проводится в зависимости от предполагаемого применения. Очищенное антитело может быть сконцентрировано и/или стерильно отфильтровано с использованием обычных методик. Растворимые агрегаты и мультимеры могут быть эффективно удалены с помощью обычных методик, включая эксклюзионную, с гидрофобным взаимодействием, ионообменную, мультимодальную или гидроксиапатитную хроматографию. Очищенное антитело может быть незамедлительно заморожено при -70 °C или может быть лиофилизировано.

Антитело A связывается с PD-1 человека и TIGIT человека

Для измерения кинетики связывания и аффинности Антитела A в отношении растворимого внеклеточного домена PD-1 человека (ВКД) (Sino Biologicals, № по каталогу 10377-H08H) и TIGIT-ВКД человека с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 37°C используется Biacore® T200 (GE Healthcare, Пискатауэй, Нью-Джерси, США). Образцы разбавляют в рабочем буфере HBS-EP+ (10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 0,05% Tween-20, pH 7,6) (Teknova, № по каталогу H8022). Сенсорный чип S-серии CM5 с белком A (GE Healthcare, № по каталогу 29127555) был приобретен у GE Healthcare.

Связывание оценивали с использованием многоцикловой кинетики методом захвата антител. Каждый цикл выполняли при 37°C при скорости потока 10 мкл/мин для захвата антител на чипе с белком A и 100 мкл/мин для ассоциации и диссоциации аналита.

Каждый цикл состоит из следующих этапов: впрыскивания Антитела А при 2 мкг/мл в HBS-EP+ с целевыми значениями Rmax 50 ед. ответа (RU) на проточной ячейке, впрыскивания аналита в HBS-EP+ в течение 180 или 200 секунд (диапазон концентраций от 1000 нМ до 1,95 нМ путем двукратного последовательного разведения для PD-1-ВКД-His (PD-1 человека-ВКД-his (Sino Biologicals, № по каталогу: 10377-H08H) и TIGIT-ВКД-His человека (SEQ ID NO: 32), соответственно) с последующей 600-секундной фазой диссоциации и регенерацией с использованием 5 мкл 10 мМ гидрохлорида глицина, pH 1,5 при контакте в течение 30 секунд, используя скорость потока 10 мкл/мин. Все концентрации аналита определяли с использованием значений мономерной молекулярной массы (MW). Скорости ассоциации (k_{on}) и скорости диссоциации (k_{off}) для PD-1-ВКД человека оценивали с использованием двух референсных значений путем вычитания референсного значения проточной ячейки 1 в дополнение к вычитанию значения холостой пробы при 0 нМ и аппроксимировали к модели «связывания 1:1 (Ленгмюра)» в программном обеспечении BIAevaluation, версии 4.1. Константу диссоциации (K_D) рассчитывали на основании кинетики связывания в соответствии с соотношением $K_D=K_{off}/K_{on}$. Стехиометрия=$[RU_{макс}/RU_{захвачено}]/[MW_{аналит}/MW_{антитело}]$, где $MW_{Антитело\ А}$ составляет 150 кДа. Значения представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (СО).

В экспериментах, выполненных по существу так, как описано выше, результаты в Таблице 2 демонстрируют, что Антитело А связывается с PD-1-ВКД человека, TIGIT-ВКД человека, PD-1 яванской макаки и TIGIT яванской макаки.

Таблица 2

Вид	**Скорость прямой реакции (k_{on}) ($M^{-1}c^{-1}$) (± СОС)**	**Скорость обратной реакции (k_{off}) (c^{-1}) (± СОС)**	**Аффинность (K_D) (M)[a] (± СОС)**	**Стехиометрия (± СОС)**
ВКД PD-1 человека (n=3)	$2,0 \pm 0,2\times10^{5}$	$5,0 \pm 0,7\times10^{-4}$	$2,43 \pm 0,04\times10^{-9}$	$1,29 \pm 0,02$
PD-1 яванской макаки (n=3)	$1,8 \pm 0,2\times10^{5}$	$4,5 \pm 0,7\times10^{-4}$	$2,43 \pm 0,14\times10^{-9}$	$1,08 \pm 0,01$
ВКД TIGIT человека (n=3)	$1,6 \pm 0,3\times10^{6}$	$4,2 \pm 1,2\times10^{-4}$	$0,25 \pm 0,04\times10^{-9}$	$0,837 \pm 0,003$
TIGIT яванской макаки (n=3)	$2,9 \pm 0,4\times10^{6}$	$1,1 \pm 0,1\times10^{-3}$	$0,36 \pm 0,01\times10^{-9}$	$0,90 \pm 0,01$

Антитело А оказывает антагонистическое действие на активность PD-1/PD-L1 человека в клеточном анализе.

Способность Антитела А оказывать антагонистическое действие на активность, опосредуемую связыванием PD-1 человека с PD-L1 человека, тестируют с использованием репортерного анализа NFAT-Luc. В общих чертах, в качестве антигенпрезентирующих клеток используют клетки CHO-K1, экспрессирующие PD-L1 человека и искусственный активатор рецептора клеточной поверхности Т-клеток (TCR) (Promega, CS187108, часть системы анализа блокирования PD-1/PD-L1, модель размножения CS187109). TIGIT человека вводят с помощью ретровирусного переноса в клетки Jurkat, экспрессирующие PD-1 человека и репортер NFAT-Luc2 (GloResponse NFAT-luc2/PD-1 Jurkat, Promega CS187102, часть системы анализа блокирования PD-1/PD-L1, модель размножения CS187109). Клетки CHO-K1+PD-L1+PVR+активатор TCR (при пересевах с 7 по 9) отделяют с помощью трипсина и высевают из расчета 40000 клеток/лунку в белые непрозрачные 96-луночные планшеты для тканевых культур (Costar 35-3296) в 100 мкл ростовой среды. Ростовая среда для CHO-K1+PD-L1+активатор TCR состоит из среды Хэма F-12 (Corning Cellgro 10-080-CV) с 10% охарактеризованной фетальной бычьей сыворотки (ФБС) (HyClone SH30070.03), 200 мкг/мл гигромицина B (Thermo Fisher 10687-010) и 250 мкг/мл G418 (генетицин, Corning 30-234-CI). Клетки выращивают в течение ночи при 37°C, 5% CO_2 и 95% относительной влажности. На следующий день готовят антитела, показанные в Таблице 3, с двукратной рабочей концентрацией в RPMI 1640 с 2

мМ L-глутамина и 10 мМ HEPES (Gibco 22400) с 2% охарактеризованной ФБС (HyClone SH30070.03).

Клетки Jurkat, экспрессирующие PD-1 человека, TIGIT человека и репортер NFAT-Luc2, размножают в RPMI 1640 с 2 мМ L-глутамина и 10 мМ HEPES (Gibco), 10% охарактеризованной ФБС (HyClone), 100 мкг/мл гигромицина B (Thermo Fisher), 500 мкг/мл G418 (генетицин, Corning) и 1 мкг/мл пуромицина (Calbiochem 540411, в стерильной воде). Клетки Jurkat между пересевами с 5 по 7 центрифугируют и ресуспендируют в RPMI/2% охарактеризованной ФБС в концентрации $1,25\times10^6$ клеток/мл. По 95 мкл сред осторожно удаляют из монослоев клеток CHO+PD-L1+PVR+активатор TCR в 96-луночных планшетах. По 40 мкл антител в двукратной концентрации, приготовленных, как описано выше (включая контроль только со средой), добавляют с тремя повторами для каждой обработки, как указано в Таблице 3. Затем добавляют по 40 мкл на лунку ресуспендированных клеток Jurkat+PD-1+TIGIT+NFAT-Luc2 (50000 клеток/лунку). Планшеты для анализа инкубируют в течение 6 часов при 37°C, 5% CO_2, 95% относительной влажности. В конце инкубации планшеты уравновешивают в течение 5-10 минут при комнатной температуре (RT). Добавляют 80 мкл/лунку восстановленного субстрата люциферазы Bio-Glo™ (Promega G7940), и планшеты дополнительно инкубируют в течение 5-10 минут при комнатной температуре. Показатели планшетов считывают на многорежимном считывающем устройстве Perkin Elmer Envision с программным обеспечением EnVision Manager v.1.13.3009.1409, сверхчувствительным режимом и временем интеграции 0,2 секунды. Для каждого планшета значения люминесценции (относительные световые единицы (RLU)) нормируют к значениям, полученным для клеток, обработанных только средой (кратная индукция=RLU обработка/RLU только контрольная среда). Значения $ЭК_{50}$ рассчитывают с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 7.

В экспериментах, выполненных по существу так, как описано выше, результаты в Таблице 3 демонстрируют, что значения $ЭК_{50}$ для Антитела A и анти-PD-1 человека-IgG4-PAA составляют 1,838 нМ и 1,226 нМ, соответственно, и что Антитело A связывается и оказывает антагонистическое действие на связывание PD-1 человека/PD-L1 человека в клеточном анализе.

Таблица 3

	Антитело A	**Анти-TIGIT человека-hIgG1-EN**	**Анти-PD-1 человека-IgG4-PAA**	**hIgG1-EN**
$ЭК_{50}$ (нМ)	1,838	0,6664	1,226	>171
Максимальное кратное изменение (при 171 нМ)	2,21	1,7	1,84	1,08

Антитело A оказывает антагонистическое действие на TIGIT человека в клеточном анализе

Как PD-1 человека, так и TIGIT экспрессируются или совместно экспрессируются в активированных лимфоцитах, инфильтрирующих опухоль. Способность Антитела A оказывать антагонистическое действие на активность, опосредуемую TIGIT человека, тестируют в репортерных анализах Jurkat NFAT-Luc, сконструированных для совместной экспрессии PD-1 человека (9000 рецепторов PD-1/клетку) и TIGIT человека (5500 рецепторов TIGIT/клетку). В общих чертах, антитела, показанные в Таблице 4, инкубируют с клетками Jurkat+TIGIT человека+PD-1 человека+NFAT-Luc в течение 6 часов. Добавляют субстрат люциферазы Bio-Glo и считывают люминесценцию в конце инкубации. Данные (кратная индукция = RLU обработка/RLU только контрольная среда) представлены как среднее значение для трех лунок на обработку в Таблице 4.

В экспериментах, выполненных по существу так, как описано выше, результаты в Таблице 4 демонстрируют, что Антитело A связывается с TIGIT человека и оказывает на него антагонистическое действие в клеточном анализе.

Таблица 4

	Антитело A	**Анти-PD-1 человека-hIgG4-PAA**	**Анти-TIGIT человека-hIgG1-EN**	**hIgG1-EN**
$ЭК_{50}$ (нМ)	7,869	>171	0,1806	>171
Максимальное кратное изменение (при 171 нМ)	1,95	1,22	1,64	1,1

Антитело А одновременно связывается с PD-1 и TIGIT в клеточном анализе

Рецепторы PD-1 и TIGIT помечают с использованием Prolink и Enzyme Activator, соответственно, и совместно экспрессируют в клетках 293. При связывании Антитела А с рецепторами PD-1 человека и TIGIT человека указанные рецепторы оказываются в непосредственной близости, что позволяет восстановить активный фермент бета-галактозидазы, который гидролизует субстрат с генерацией хемилюминесцентного сигнала.

В экспериментах, выполненных по существу так, как описано выше, результаты в Таблице 5 демонстрируют, что Антитело А физически одновременно взаимодействует с рецепторами PD-1 человека и TIGIT человека. Эффект не наблюдается при использовании контрольного IgG1 или антител к TIGIT человека и к PD-1 человека, или комбинации антител к TIGIT человека и к PD-1 человека.

Таблица 5

Вид	**Антитело А**	**Анти-PD-1 человека-hIgG4-PAA**	**Анти-PD-1 человека-hIgG4-PAA+анти-TIGIT-hIgG1-EN**	**hIgG1-EN**
$ЭК_{50}$ (нМ)	0,4307	>200	>200	>200

Антитело А индуцирует активацию Т-клеток в реакции смешанной культуры первичных лимфоцитов (реакции MLR)

Функцию Антитела А по блокированию PD-1 человека исследуют в анализах алло-MLR человека. Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) человека получают либо замороженными (AllCells), либо из свежей цельной крови, подвергнутой плазмаферезу (Indiana Blood Center) и разделенной в градиенте плотности Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare). Моноциты $CD14^+$ выделяют с помощью набора для выделения моноцитов человека II или микрогранул CD14 (Miltenyi Biotec) и сепаратора AutoMACS Pro (Miltenyi Biotec). Незрелые дендритные клетки (ДК) получают путем культивирования моноцитов в полной среде RPMI-1640, содержащей 10% ФБС, в присутствии 1000 МЕ/мл hGM-CSF (R&D; 215-GM-050 или Sanofi; лейкин, сарграмостим; NDC 0024-5843-01) и 500 МЕ/мл hIL-4 (R&D; 204-IL-050 или другой источник) в течение 2 дней (Таблица 6). $CD4^+$ Т-клетки очищают из свежих МКПК человека от разных здоровых доноров (AllCells или Indiana Blood Center) с использованием набора для выделения $CD4^+$ Т-клеток человека (Miltenyi Biotec). Два типа клеток от разных доноров затем смешивают в 96-луночных планшетах с V-образным дном в полной среде AIM-V (Thermo Fisher Scientific), содержащей от 5×10^4 до 1×10^5 $CD4^+$ Т-клеток и 5×10^3 незрелых ДК на лунку. Антитела,

как показано в Таблице 6, последовательно разводят и добавляют в планшеты с тремя повторами из расчета 100 мкл/лунку. Планшеты инкубируют 4 дня при 37°C в 5% CO_2. Супернатанты собирают и подвергают ИФА IFN-γ (R&D Systems; SIF50 или DY285) в соответствии с инструкциями производителя. Антитела тестируют на девяти различных донорных парах. Значения $ЭК_{50}$ рассчитывают с использованием данных от трех донорных пар Т:ДК с помощью программного обеспечения GraphPad Prism (GraphPad Software).

В экспериментах, выполненных по существу так, как описано выше, результаты в Таблице 6 неожиданно демонстрируют, что Антитело А проявляет повышенную активность блокирования PD-1 человека по сравнению с антителом к PD-1 по отдельности или комбинацией антитело к PD-1 человека + антитело к TIGIT человека, согласно измерению максимального кратного увеличения уровней IFNγ по сравнению с контрольным IgG1.

Таблица 6

Антитела	**Антитело А**	**Анти-PD-1 человека-hIgG4-PAA**	**Анти-TIGIT человека-hIgG1-EN**	**Анти-PD-1 человека-hIgG4-PAA+анти-TIGIT человека-hIgG1-EN**
$ЭК_{50}$ (нМ)	9,07	0,016	24,41	0,062
IFNγ Максимальное кратное увеличение	12,27	3,85	2,83	5,64

Антитело А индуцирует активацию Т-клеток в тесте на вторичный иммунный ответ на столбнячный анатоксин

Замороженные МКПК от субъекта с ответом на столбнячный анатоксин размораживают в теплой полной среде AIM-V и оставляют в покое на 24 часа. После периода покоя клетки пропускают через фильтр с размером пор 30 микрон, чтобы удалить крупный мусор и агрегаты. Клетки подсчитывают и ресуспендируют до $2,5\times10^6$ клеток/мл в полной среде AIM-V и высевают из расчета 5×10^5 клеток/лунку в 200 мкл в 96-луночном планшете с U-образным дном. Антитела, как показано в Таблице 7, добавляют при 20 мкг/мл и последовательно разводят 1:3. Клетки стимулируют 4 нг/мл столбнячного

анатоксина и инкубируют при 37°C в течение 48 часов. Затем уровни IFNγ в супернатанте количественно определяют с использованием набора MSD (Mesoscale Discovery).

В экспериментах, выполненных по существу, как описано выше, результаты в Таблице 7 и Таблице 8 демонстрируют, что добавление Антитела A (Таблица 7) или комбинации антитело к PD-1 человека + антитело к TIGIT человека (Таблица 8) усиливает активацию Т-клеток дозозависимым образом, согласно измерению высвобождения IFNγ.

Таблица 7

Антитело мкг/мл	**Клетки, обработанные антителом A Уровни IFNγ**			**Антитело A среднее**	**Антитело A CO**
20	4890,53	927,51	3601,64	3139,89	2021,46
6,67	4400,90	2865,88	2901,18	3389,32	876,23
2,22	3801,46	2733,48	2775,13	3103,36	604,93
0,74	1717,98	7374,75	2090,72	3727,82	3163,83
0,25	1224,61	1771,20	2698,75	1898,19	745,23
0,08	1394,55	684,00	1493,15	1190,56	441,46

Таблица 8

Антитело мкг/мл	**Клетки, обработанные анти-PD-1 человека-hIgG5-PAA + анти-TIGIT человека-hIgG1-EN Уровни IFNγ**			**Анти-PD-1 человека-hIgG4-PAA + анти-TIGIT человека-hIgG1-EN среднее**	**Анти-PD-1 человека-hIgG4-PAA + анти-TIGIT человека-hIgG1-EN CO**
20	3404,44	5641,61	4724,52	4590,19	1124,61
6,67	1286,80	2718,54	2783,72	2263,02	846,06
2,22	2022,00	4312,19	14129,19	6821,13	6431,73
0,74	1259,72	1401,27	2815,09	1825,36	860,05
0,25	488,85	1132,18	2171,95	1264,33	849,30
0,08	839,55	1235,07	792,87	955,83	242,95

Антитело А демонстрирует противоопухолевую эффективность в ксенотрансплантатной модели опухоли HCC827 NSG с приживленными Т-клетками человека.

В День 0 10×10^6 клеток HCC827 ресуспендируют в 0,2 мл раствора матригеля и подкожно имплантируют в правый бок самок мышей NOD/SCID Gamma (NSG) (Jackson Laboratories), которым приживили Т-клетки человека. В День 40 мышей рандомизируют при n=8 и вводят внутрибрюшинно (в/б) дозу 10 мг/кг один раз в неделю в течение 4 недель для каждой группы лечения. Группы лечения включают контрольный IgG, Антитело А, антитела анти-PD-1 человека-hIgG4-PAA, анти-TIGIT человека-hIgG1-EN и анти-PD-1 человека-hIgG4-PAA + анти-TIGIT человека-hIgG1-EN. Антитело А также вводят в дозе 1 мг/кг и 3 мг/кг еженедельно в течение 4 недель. Массу тела и объем опухоли измеряют два раза в неделю. Объем опухоли ($мм^3$) рассчитывают как $\pi/6$*Длина*Ширина^2, и % Т/С рассчитывают как $100\times\Delta T/\Delta C$, если $\Delta T>0$ среднегеометрических значений. Статистический анализ выполняют с использованием процедур в программном обеспечении SAS.

В экспериментах, выполненных по существу так, как описано выше, результаты в Таблице 9 демонстрируют, что Антитело А, введенное в дозе 1 мг/кг, 3 мг/кг или 10 мг/кг, значительно ингибирует рост опухоли ($p<0,001$, соответственно) у мышей с приживленными Т-клетками человека относительно группы, обработанной контрольным IgG. Антитело А во всех 3 дозах также неожиданно демонстрирует статистически значимую эффективность по сравнению с группой лечения, получавшей комбинацию антитело к PD-1 человека + антитело к TIGIT человека, с $p<0,001$ и $p<0,334$, соответственно.

Таблица 9

	Ксенотрансплантат	**Р-значение для объема опухоли**	**% Т/С**
Контрольный IgG 10 мг/кг	HCC827 без приживления	p=0,174	122,9
Контрольный IgG 10 мг/кг	HCC827	Н/П	Н/П
Анти-PD-1 человека-hIgG4-PAA 10 мг/кг	HCC827	p=0,872	97,3
Анти-Tigit человека-hIgG1-EN 10 мг/кг	HCC827	p<0,001	28,4
Анти-PD-1 человека-IgG4-PAA + анти-TIGIT человека-hIgG1-EN 10 мг/кг каждый	HCC827	p=0,334	85,8
Антитело А 1 мг/кг	HCC827	p<0,001	28,4
Антитело А 3 мг/кг	HCC827	p<0,001	25,3
Антитело А 10 мг/кг	HCC827	p<0,001	24

Н/П=неприменимо

Антитело А демонстрирует противоопухолевую эффективность и увеличение количества CD226$^+$ CD8 Т-клеток и CD226$^+$ NK-клеток в ксенотрансплантатной модели опухоли HCC827 NSCLC CD34 NSG.

В День 0 10×10^6 HCC827 подкожно имплантируют в правый бок самок мышей NOD/SCID Gamma (NSG), которым приживили CD34$^+$ гемопоэтические стволовые клетки (Jackson Laboratories). В День 21 мышей рандомизируют при n=8 на группу и вводят внутрибрюшинно (в/б) дозу 10 мг/кг один раз в неделю в течение 4 недель для каждой группы лечения. Группы лечения включают контрольный IgG, Антитело А, антитела анти-PD-1 человека-hIgG4-PAA, анти-TIGIT человека-hIgG1-EN и анти-PD-1 человека-hIgG4-PAA + анти-TIGIT человека-hIgG1-EN. Массу тела и объем опухоли измеряют два раза в неделю. Объем опухоли (мм^3) рассчитывают как π/6*Длина*Ширина^2, и % Т/С рассчитывают как $100\times\Delta T/\Delta C$, если $\Delta T>0$ среднегеометрических значений. Статистический анализ выполняют с использованием СМЕШАННЫХ процедур в программном обеспечении SAS.

В экспериментах, выполненных по существу так, как описано выше, результаты в Таблице 10 демонстрируют, что Антитело А, введенное в дозе 10 мг/кг, значительно ингибирует рост опухоли ($p<0,001$) у мышей с приживленными $CD34^+$ гемопоэтическими стволовыми клетками человека относительно группы, обработанной контрольным IgG. Антитело А также неожиданно демонстрирует значительную противоопухолевую эффективность по сравнению с группой лечения комбинацией антитело к PD-1 человека + антитело к TIGIT человека с $p<0,001$ и $p<0,006$, соответственно.

Таблица 10

	Ксенотрансплантат	**P-значение для объема опухоли**	**% T/C**
Контрольный IgG 10 мг/кг	HCC827 без приживления	p<0,001	5874,0
Контрольный IgG 10 мг/кг	HCC827 + CD34	Н/П	Н/П
Анти-PD-1 человека-hIgG4-PAA 10 мг/кг	HCC827 + CD34	p=0,047	74,6
Анти-TIGIT человека-hIgG1-EN 10 мг/кг	HCC827 + CD34	p=0,040	136,5
Анти-PD-1 человека-hIgG4-PAA + анти-TIGIT человека-hIgG1-EN 10 мг/кг каждый	HCC827 + CD34	p=0,006	64,6
Антитело А 10 мг/кг	HCC827 + CD34	p<0,001	53,7

Н/П=неприменимо

По окончании исследования опухоли собирают и обрабатывают с получением суспензии отдельных клеток. Лимфоциты, инфильтрирующие опухоль (TIL), окрашивают антителами в 300 мкл буфера для FACS. Данные проточной цитометрии регистрируют с использованием LSRFortessa X20 и анализируют с использованием FlowJo 10. $CD226^+$ CD8 Т-клетки показаны в Таблице 11 как % от общего количества CD8 Т-клеток ($CD8^+CD3^+CD45^+$ живые лимфоциты) в TIL каждой мыши. $CD226^+$ NK-клетки показаны в Таблице 11 как % от общего количества NK-клеток ($CD56^+CD3^-CD45^+$ живые лимфоциты) в TIL каждой мыши.

В экспериментах, выполненных по существу так, как описано выше, результаты в Таблице 11 и Таблице 12 демонстрируют, что мыши, получавшие Антитело А, проявляют увеличение процента $CD226^+$CD8 Т-клеток и $CD226^+$ NK-клеток, в то время как мыши, получавшие антитело к PD-1 человека, показывают увеличение количества только $CD226^+$ NK-клеток. Поскольку было показано, что передача сигналов CD226 имеет решающее значение для противоопухолевой активности, увеличение количества $CD226^+$ клеток как в популяции CD8, так и в популяции NK-клеток в группе лечения Антителом А может указывать на потенциально повышенную цитотоксичность, которая может вносить вклад в противоопухолевую активность Антитела А, наблюдаемую в исследовании.

Таблица 11 – % CD226-положительных CD8 Т-клеток

	IgG	**Анти-PD-1 человека-hIgG4-PAA**	**Анти-TIGIT человека-hIgG1-EN**	**Анти-PD-1 человека-hIgG4-PAA + анти-TIGIT человека-hIgG1-EN**	**Антитело А**
№ 1	21,4	37,5	32,1	40	56,9
№ 2	23,9	82,2	53,6	20,9	64,3
№ 3	30,2	50	47	17,7	60
№ 4	33	60,3	22,1	57,1	50
№ 5	26,6	31,5	15	36	28,6
№ 6	59,3	40,6	48,5	75	50
№ 7	45,4	32,1	35,1	57,5	60
№ 8	45,1	56,2	19,9	23	
среднее	35,6	48,8	34,2	40,9	52,8
СОС	4,6	6,1	5,1	7,3	4,5
Р-значение в сравнении с IgG	Н/П	p=0,107	p=0,837	p=0,551	p=0,020

Таблица 12 – % CD226-положительных NK-клеток

	IgG	**Анти-PD-1 человека-hIgG4-PAA**	**Анти-TIGIT человека-hIgG1-EN**	**Анти-PD-1-hIgG4-PAA + анти-TIGIT человека-hIgG1-EN**	**Антитело A**
№ 1	40	53,1	47,2	60,9	49,1
№ 2	49,9	61	60,3	22,1	62,7
№ 3	45,2	59,8	50,3	54,2	66,7
№ 4	57	49,7	41,5	60	72
№ 5	57,1	57,7	33,9	61,8	72,2
№ 6	49,5	49,6	58,1	71,6	88,4
№ 7	46,1	54,3	56,3	68,4	89,4
№ 8	49,8	63,6	29,3	56,6	
среднее	49,3	56,1	47,1	57,0	71,5
СОС	2,0	1,9	4,0	5,4	5,4
Р-значение в сравнении с IgG	Н/П	p=0,028	p=0,633	p=0,206	p=0,0013

Через 6 дней после введения последней дозы сывороточные уровни анти-PD-1 человека-hIgG4-PAA, анти-TIGIT человека-hIgG1-EN и Антитела A анализируют с помощью ИФА. Рекомбинантный PD-1 человека-his (R&D Systems, № по каталогу 8986-PD) и рекомбинантный TIGIT человека-his (R&D Systems, № по каталогу 9525-TG) используют для ИФА с захватом PD-1 и TIGIT, соответственно. Для детектирования используют ПХ-конъюгированный мышиный Ig к Fc IgG человека (Southern Biotech/9040-05).

В экспериментах, выполненных по существу так, как описано выше, результаты в Таблице 13 демонстрируют, что сывороточные уровни Антитела A, измеренные с помощью ИФА с захватом антигена PD-1 человека и TIGIT человека, сопоставимы, что свидетельствует о стабильности антитела *in vivo*.

Таблица 13

Группы лечения (аналит)	**Сывороточные уровни антитела (нг/мл)**
Анти-PD-1 человека-hIgG4-PAA (PD-1)	137242
Анти-PD-1 человека-hIgG4-PAA (PD-1)	214785
Анти-PD-1 человека-hIgG4-PAA (PD-1)	260079
Анти-PD-1 человека-hIgG4-PAA (PD-1)	271484
Анти-PD-1 человека-hIgG4-PAA (PD-1)	179951
Анти-PD-1 человека-hIgG4-PAA (PD-1)	144798
Анти-PD-1 человека-hIgG4-PAA (PD-1)	148762
Анти-PD-1 человека-hIgG4-PAA (PD-1)	207223
Среднее	**195541**
CO	**51885**
Анти-TIGIT человека-hIgG1-EN (TIGIT)	69087
Анти-TIGIT человека-hIgG1-EN (TIGIT)	90291
Анти-TIGIT человека-hIgG1-EN (TIGIT)	94828
Анти-TIGIT человека-hIgG1-EN (TIGIT)	97295
Анти-TIGIT человека-hIgG1-EN (TIGIT)	91847
Анти-TIGIT человека-hIgG1-EN (TIGIT)	55174
Анти-TIGIT человека-hIgG1-EN (TIGIT)	52438
Анти-TIGIT человека-hIgG1-EN (TIGIT)	87853
Среднее	**79852**
CO	**18212**
Антитело A (PD-1)	96794
Антитело A (PD-1)	135103
Антитело A (PD-1)	152474
Антитело A (PD-1)	144320
Антитело A (PD-1)	107847
Антитело A (PD-1)	116441
Антитело A (PD-1)	160017
Антитело A (PD-1)	169076
Среднее	**135259**
CO	**25967**
Антитело A (TIGIT)	92771
Антитело A (TIGIT)	99719

Антитело A (TIGIT)	101530
Антитело A (TIGIT)	87067
Антитело A (TIGIT)	66332
Антитело A (TIGIT)	85640
Антитело A (TIGIT)	89285
Антитело A (TIGIT)	139837
Среднее	**95272**
CO	**20992**

Аминокислотные и нуклеотидные последовательности

SEQ ID NO: 1 (аминокислотная последовательность HCDR1 TIGIT)
AASGFDFSSYGVP
SEQ ID NO: 2 (аминокислотная последовательность HCDR2 TIGIT)
YIDPIFGPTYYADEVKG
SEQ ID NO: 3 (аминокислотная последовательность HCDR3 TIGIT)
ARDYSYGYAYALDI
SEQ ID NO: 4 (аминокислотная последовательность LCDR1 TIGIT)
QASQRISPYLA
SEQ ID NO: 5 (аминокислотная последовательность LCDR2 TIGIT)
SRASKLAS
SEQ ID NO: 6 (аминокислотная последовательность LCDR3 TIGIT)
QSYYVHTSSGYA
SEQ ID NO: 7 (аминокислотная последовательность HCDR1 PD-1)
KASGGTFSSYAIS
SEQ ID NO: 8 (аминокислотная последовательность HCDR2 PD-1)
LIIPSFDTAGYAQKFQG
SEQ ID NO: 9 (аминокислотная последовательность HCDR3 PD-1)
ARAEHSSTGTFDY
SEQ ID NO: 10 (аминокислотная последовательность LCDR1 PD-1)
RASQGISSWLA
SEQ ID NO: 11 (аминокислотная последовательность LCDR2 PD-1)
SAASSLQS
SEQ ID NO: 12 (аминокислотная последовательность LCDR3 PD-1)
QQANHLPFT
SEQ ID NO: 13 (аминокислотная последовательность HCVR TIGIT)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSSYGVPWVRKAPGKGLEWVGYIDPIFGPTY
YADEVKGRFTISADDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARDYSYGYAYALDIWGQGTL
VTVSS
SEQ ID NO: 14 (аминокислотная последовательность LCVR TIGIT)
RIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCQASQRISPYLAWYLDKPGQPPQLLISRASKLASGVPDR
FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQSYYVHTSSGYAFGGGTKVEIK
SEQ ID NO: 15 (аминокислотная последовательность HCCR TIGIT)
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVADYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDERVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
GDMTKNQVQLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLASKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 16 (аминокислотная последовательность LCCR TIGIT)

RTVAAPSVFIFPPSDKQLKSGTARVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 17 (аминокислотная последовательность HCVR PD-1)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRYAPGQGLEWMGLIIPSFDTAG
YAQKFQGRVAITVDESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAEHSSTGTFDYWGRGTLVT
VSS

SEQ ID NO: 18 (аминокислотная последовательность LCVR PD-1)

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQRKPGDAPKLLISAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANHLPFTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 19 (аминокислотная последовательность HCCR PD-1)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVATGPAVLQS
SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVSTLPPS
REEMTKNQVSLMCLVYGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSVLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 20 (аминокислотная последовательность LCCR PD-1)

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCYISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPS
KQSNNKYAAWSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC

SEQ ID NO: 21 (аминокислотная последовательность HC TIGIT)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSSYGVPWVRKAPGKGLEWVGYIDPIFGPTY
YADEVKGRFTISADDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARDYSYGYAYALDIWGQGTL
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVADYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDERVEPKSCDKTHTCPPCPAP
EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRGDMTKNQVQLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLA
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 22 (аминокислота LC TIGIT)

RIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCQASQRISPYLAWYLDKPGQPPQLLISRASKLASGVPDR
FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQSYYVHTSSGYAFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIF
PPSDKQLKSGTARVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 23 (аминокислотная последовательность HC PD-1)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRYAPGQGLEWMGLIIPSFDTAG
YAQKFQGRVAITVDESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAEHSSTGTFDYWGRGTLVT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVATGPAV
LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE
AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVS
TLPPSREEMTKNQVSLMCLVYGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
VLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 24 (аминокислотная последовательность LC PD-1)

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQRKPGDAPKLLISAASSLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANHLPFTFGGGTKVEIKGQPKAAPSVTLFPP
SSEELQANKATLVCYISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAAWSYL
SLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC

SEQ ID NO: 25 (последовательность ДНК HC TIGIT)

ATGGAGACGGACACTCTGCTCCTGTGGGTGCTCCTGCTTTGGGTACCGGGTTCAACG
GGAGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGAGGGTCCCT
GAGACTCTCCTGTGCTGCTTCTGGATTCGACTTCAGTAGTTATGGAGTGCCCTGGGT
CCGCAAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTGGCTACATTGATCCTATTTTTGG
TCCCACATACTACGCAGACGAGGTGAAGGGCAGATTCACCATCTCAGCTGATGATTC
AAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACGGCCGTGT
ATTACTGTGCGAGAGACTATAGTTATGGTTATGCTTATGCTCTCGACATCTGGGGCC
AGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCC
TGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCG
CCGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGC
GGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC
GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAAT
CACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACGAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAA
AACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCCGCAGGGGGACCGTCAGTCT
TCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCA
CATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAT

GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACA
ACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAAGACTGGCTGAATG
GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGCCGCCCCCATCGAGAAA
ACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCC
ATCCCGGGGGGGACATGACCAAGAACCAAGTCCAGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCT
TCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC
TACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGCTTCCAAG
CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGAT
GCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGCA
AA

SEQ ID NO: 26 (последовательность ДНК LC TIGIT)

ATGGAAACTGACACCCTGCTGCTCTGGGTACTGCTCCTTTGGGTTCCTGGGAGCACA
GGCCGGATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCTCTGTCCGTCACCCCTGGACAGCCG
GCCTCCATCTCCTGCCAGGCCAGTCAGAGAATTAGTCCCTACTTAGCCTGGTACCTG
GACAAGCCAGGCCAGCCTCCACAGCTCCTGATCTCCCGGGCATCCAAACTGGCATCT
GGAGTGCCAGATAGGTTCAGTGGCAGCGGGTCAGGGACAGATTTCACACTGAAAAT
CAGCCGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCCAAAGTTATTATGTTCA
CACTAGTAGTGGTTATGCTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGGACCG
TGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATAAGCAGTTGAAATCTGGAA
CTGCCAGAGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGT
GGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAG
GACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGA
CTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACTCATCAGGGCCTGAGCTCGC
CCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGC

SEQ ID NO: 27 (последовательность ДНК HC PD-1)

ATGGAAACCGATACGCTCCTGCTGTGGGTTCTCCTCTTGTGGGTCCCCGGCTCTACC
GGGCAGGTCCAGCTCGTGCAGAGTGGCGCCGAGGTCAAAAAACCCGGTTCAAGCGT
GAAGGTGTCTTGTAAAGCATCTGGAGGAACCTTTAGTTCCTACGCCATTAGTTGGGT
GAGGTACGCTCCCGGCCAGGGCTTGGAATGGATGGGTTTGATTATTCCCAGCTTTGA
TACAGCTGGATACGCGCAGAAGTTCCAGGGACGCGTGGCCATCACCGTGGATGAAA
GCACTTCAACTGCCTACATGGAACTGTCATCCTTGAGAAGCGAGGATACTGCTGTTT
ACTACTGCGCTAGGGCAGAGCACTCCTCCACCGGGACCTTCGACTATTGGGGTCGAG
GTACTCTCGTGACCGTGAGCAGCGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGG
CACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG
GACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGG

CGTGGCCACCGGCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGT
GGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCA
CAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAA
CTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCCGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCC
TCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACAT
GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTATGTG
GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACA
GCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAAGACTGGCTGAATGGCA
AGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGCCGCCCCCATCGAGAAAACC
ATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTCCACCCTGCCCCCATC
CCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAAGTCAGCCTGATGTGCCTGGTCTATGGCTTCT
ATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTAC
AAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTATTCCGTGCTCA
CCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT
GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGCAAA

SEQ ID NO: 28 (последовательность ДНК LC PD-1)

ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGATCCACT
GGTGACATCCAGATGACACAGTCACCTTCAAGCGTCTCCGCCTCCGTGGGAGACAG
GGTTACTATTACATGTAGGGCCAGCCAGGGGATCTCTTCATGGCTGGCGTGGTACCA
ACGGAAGCCAGGCGACGCCCCCAAGCTCCTTATCTCCGCTGCCTCCTCTCTGCAGTC
CGGAGTTCCCTCCCGCTTCAGCGGTAGCGGGTCAGGCACTGACTTCACCCTTACAAT
CTCTTCTCTGCAACCTGAGGACTTCGCCACATATTATTGCCAGCAGGCAAACCATTT
GCCATTTACTTTTGGCGGAGGTACTAAGGTTGAGATTAAAGGCCAGCCTAAAGCTGC
CCCTAGCGTTACCCTTTTCCCACCGAGCTCCGAGGAGCTGCAGGCCAATAAAGCAAC
CTTGGTCTGCTACATATCAGATTTTTACCCTGGCGCCGTGACCGTAGCATGGAAAGC
TGATTCATCCCCTGTGAAGGCCGGTGTTGAAACTACAACCCCTTCCAAACAATCTAA
CAATAAATACGCGGCATGGTCCTACCTGTCCTTGACACCCGAGCAGTGGAAATCTCA
CAGATCTTACAGCTGCCAGGTCACCCACGAGGGGAGCACTGTGGAGAAGACCGTCG
CGCCCACTGAGTGC

SEQ ID NO: 29 (аминокислотная последовательность PD-1 человека)

MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSN
TSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRN
DSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVVGVVGG
LLGSLVLLVWVLAVICSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTP
EPPVPCVPEQTEYATIVFPSGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL

SEQ ID NO: 30 (аминокислотная последовательность ВКД-His PD-1 человека)

LDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPE
DRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELR
VTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQHHHHHH

SEQ ID NO: 31 (аминокислотная последовательность TIGIT человека)

MRWCLLLIWAQGLRQAPLASGMMTGTIETTGNISAEKGGSIILQCHLSSTTAQVTQVNW
EQQDQLLAICNADLGWHISPSFKDRVAPGPGLGLTLQSLTVNDTGEYFCIYHTYPDGTY
TGRIFLEVLESSVAEHGARFQIPLLGAMAATLVVICTAVIVVVALTRKKKALRIHSVEGD
LRRKSAGQEEWSPSAPSPPGSCVQAEAAPAGLCGEQRGEDCAELHDYFNVLSYRSLGN
CSFFTETG

SEQ ID NO: 32 (аминокислотная последовательность ВКД-His TIGIT человека)

HHHHHHGGGGSMMTGTIETTGNISAEKGGSIILQCHLSSTTAQVTQVNWEQQDQLLAIC
NADLGWHISPSFKDRVAPGPGLGLTLQSLTVNDTGEYFCIYHTYPDGTYTGRIFLEVLES
SVAEHGARFQIPGGGGSHHHHHH

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептидная молекула, которая связывается с TIGIT человека (SEQ ID NO: 31), содержащая аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1-6.

2. Полипептидная молекула по п. 1, дополнительно содержащая аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7-12, отличающаяся тем, что указанная полипептидная молекула также связывается с PD-1 человека (SEQ ID NO: 29).

3. Полипептидная молекула по п. 1 или п. 2, отличающаяся тем, что указанная полипептидная молекула представляет собой молекулу scFv.

4. Полипептидная молекула по п. 3, отличающаяся тем, что указанная молекула scFv представляет собой полиспецифичную молекулу scFv.

5. Полипептидная молекула по п. 4, отличающаяся тем, что указанная полиспецифичная молекула scFv представляет собой биспецифичную молекулу scFv.

6. Полипептидная молекула по п. 1, отличающаяся тем, что указанная полипептидная молекула представляет собой антитело или его TIGIT-связывающий фрагмент.

7. Полипептидная молекула по п. 6, отличающаяся тем, что указанная полипептидная молекула представляет собой антитело.

8. Полипептидная молекула по п. 7, отличающаяся тем, что указанное антитело представляет собой моноспецифичное антитело.

9. Полипептидная молекула по п. 7, отличающаяся тем, что указанная полипептидная молекула представляет собой полиспецифичное антитело.

10. Полипептидная молекула по п. 9, отличающаяся тем, что указанная полипептидная молекула представляет собой биспецифичное антитело.

11. Полипептидная молекула по любому из пп. 6-10, отличающаяся тем, что указанная полипептидная молекула представляет собой антитело или его TIGIT-связывающий фрагмент, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

12. Полипептидная молекула по любому из пп. 6-11, отличающаяся тем, что указанная полипептидная молекула представляет собой антитело, содержащее тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22.

13. Полипептидная молекула по любому из пп. 6-12, отличающаяся тем, что указанное антитело или его TIGIT-связывающий фрагмент также связывается с PD-1 человека (SEQ ID NO: 29) и дополнительно содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7-12.

14. Полипептидная молекула по п. 13, отличающаяся тем, что указанная полипептидная молекула представляет собой антитело, или его фрагмент, связывающий TIGIT человека и PD-1 человека, содержащее:

a) вариабельную область первой тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13;

b) вариабельную область первой легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14;

c) вариабельную область второй тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17; и

d) вариабельную область второй легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

15. Полипептидная молекула по п. 14, отличающаяся тем, что указанная полипептидная молекула представляет собой антитело, содержащее:

a) первую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21;

b) первую легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22;

c) вторую тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; и

d) вторую легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24.

16. Клетка млекопитающего, способная экспрессировать полипептидную молекулу по любому из пп. 1-15.

17. Молекула ДНК, содержащая полинуклеотид, кодирующий одну или более аминокислотных последовательностей из SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 24.

18. Молекула ДНК по п. 17, отличающаяся тем, что указанный полинуклеотид содержит одну или более последовательностей ДНК из SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 28.

19. Клетка млекопитающего, содержащая молекулу ДНК по п. 17 или п. 18.

20. Способ получения антитела, включающий культивирование клетки млекопитающего по п. 16 или п. 18 и выделение указанной полипептидной молекулы.

21. Полипептидная молекула, полученная способом по п. 20.

22. Фармацевтическая композиция, содержащая полипептидную молекулу по любому из пп. 1-15 или 21 и приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

23. Способ лечения солидной раковой опухоли, включающий введение пациенту-человеку, нуждающемуся в этом, эффективного количества полипептидной молекулы по любому из пп. 1-15 или 21.

24. Способ по п. 23, отличающийся тем, что указанная солидная раковая опухоль представляет собой рак легкого, рак молочной железы, рак головы и шеи, меланому, рак печени, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак почки, рак предстательной железы, рак яичника, рак эндометрия или гепатоцеллюлярную карциному.

25. Способ по п. 24, отличающийся тем, что указанный рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого.

26. Способ по п. 24, отличающийся тем, что указанный рак легкого представляет собой мелкоклеточный рак легкого.

27. Способ по п. 24, отличающийся тем, что указанный рак молочной железы представляет собой трижды отрицательный рак молочной железы.

28. Способ по любому из пп. 23-27, отличающийся тем, что указанную полипептидную молекулу вводят в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с ионизирующим излучением.

29. Способ по любому из пп. 23-28, отличающийся тем, что указанную полипептидную молекулу вводят в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с одним или более химиотерапевтическими агентами.

30. Полипептидная молекула по любому из пп. 1-15 или 21 для применения в терапии.

31. Полипептидная молекула по п. 30 для применения в лечении солидной раковой опухоли.

32. Полипептидная молекула для применения по п. 31, отличающаяся тем, что указанная солидная раковая опухоль представляет собой рак легкого, рак молочной железы, рак головы и шеи, меланому, рак печени, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак почки, рак предстательной железы, рак яичника, рак эндометрия или гепатоцеллюлярную карциному.

33. Полипептидная молекула для применения по п. 32, отличающаяся тем, что указанный рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого.

34. Полипептидная молекула для применения по п. 32, отличающаяся тем, что указанный рак легкого представляет собой мелкоклеточный рак легкого.

35. Полипептидная молекула для применения по п. 32, отличающаяся тем, что указанный рак молочной железы представляет собой трижды отрицательный рак молочной железы.

36. Полипептидная молекула для применения по любому из пп. 30-35, отличающаяся тем, что указанную полипептидную молекулу вводят в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с ионизирующим излучением.

37. Полипептидная молекула для применения по любому из пп. 30-36, отличающаяся тем, что указанную полипептидную молекулу вводят в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с одним или более химиотерапевтическими агентами.

38. Применение полипептидной молекулы по любому из пп. 1-16 или 21 в изготовлении лекарственного средства для лечения солидной раковой опухоли.

39. Применение полипептидной молекулы по п. 38, отличающееся тем, что указанный рак представляет собой рак легкого, рак молочной железы, рак головы и шеи, меланому, рак печени, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак почки, рак предстательной железы, рак яичника, рак эндометрия или гепатоцеллюлярную карциному.

40. Применение по п. 39, отличающееся тем, что указанный рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого.

41. Применение по п. 39, отличающееся тем, что указанный рак легкого представляет собой мелкоклеточный рак легкого.

42. Применение по п. 39, отличающееся тем, что указанный рак молочной железы представляет собой трижды отрицательный рак молочной железы.

43. Применение по любому из пп. 38-42, отличающееся тем, что указанную полипептидную молекулу вводят в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с ионизирующим излучением.

44. Применение по любому из пп. 38-43, отличающееся тем, что указанную полипептидную молекулу вводят в одновременной, раздельной или последовательной комбинации с одним или более химиотерапевтическими агентами.