

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202293376** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.05.17

(22) Дата подачи заявки
2021.06.23

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

**(54) МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА ЧЕЛОВЕКА ПРОТИВ TIGIT ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ
ИММУНООПОСРЕДОВАННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

(31) CN2020/098133

(32) 2020.06.24

(33) CN

(86) PCT/CN2021/101901

(87) WO 2021/259335 2021.12.30

(71) Заявитель:
ХУАХУЭЙ ХЭЛС ЛТД. (CN)

(72) Изобретатель:

**Суй Цзяньхуа, Ян Фан, Чжао
Линьлинь, Вэй Чжичжун (CN)**

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к антителам к TIGIT и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются как с TIGIT человека, так и с TIGIT мыши. В настоящей заявке также предложены нуклеотиды, кодирующие указанные антитела или их фрагменты, композиции или комбинации, содержащие указанные антитела или их фрагменты, и варианты применения указанных антител или их фрагментов для лечения иммуноопосредованного заболевания, такого как разные виды рака и вирусная инфекция.

202293376

A1

A1

202293376

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА ЧЕЛОВЕКА ПРОТИВ TIGIT ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ИММУНООПОСРЕДОВАННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[001] В настоящей заявке описаны выделенные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с TIGIT и блокируют функцию TIGIT, в частности, блокируют взаимодействие TIGIT с его лигандом CD155. В настоящей заявке также предложено применение указанных антител к TIGIT или их антигенсвязывающих фрагментов при лечении иммуноопосредованных заболеваний, таких как разные виды рака и вирусные инфекции.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[002] Иммунотерапевтические средства стали чрезвычайно мощными средствами для лечения различных видов рака. Один из наиболее эффективных подходов основан на блокаде рецепторов или лигандов иммунных контрольных точек.

[003] TIGIT, член семейства рецепторов полиовируса (PVR)/нектинов, представляет собой иммунорецептор, в основном экспрессируемый на активированных Т-клетках, Т-клетках памяти, NK-клетках и подгруппе регуляторных Т-клеток (Treg) (Johnston, R. J. *et al.*, 2014. *Cancer cell* 26: 923-937; Boles, K. S. *et al.*, 2009. *European journal of immunology* 39: 695-703; Yu, X., K. *et al.*, 2009. *Nature immunology* 10: 48-57; и Levin, S. D. *et al.*, 2011. *European journal of immunology* 41: 902-915). Исследования показали, что мыши TIGIT^{-/-} были более подвержены аутоиммунным реакциям, индуцированным иммунизацией (Levin S. D. *et al.*, 2011, выше; Joller, N. *et al.*, 2011. *J Immunol* 186: 1338-1342.), это свидетельствует о том, что TIGIT функционирует в качестве ингибирующего рецептора в поддержании иммунного гомеостаза. TIGIT связывает свой высокоаффинный когнатный лиганд CD155 (также известный как PVR), который экспрессируется на антигенпрезентирующих клетках (АПК), и это связывание ингибирует иммунные ответы посредством Т-клеток и АПК, а также посредством NK-клеток (Joller, N. *et al.*, 2011, выше; Stanitsky, N. *et al.*, 2009. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 17858-17863). Также было показано, что TIGIT конкурирует с CD226 за связывание с CD155 (Yu,

Х. *et al.*, 2009, выше), уравнивая таким образом опосредуемую CD226 костимулирующую Т-клеточную сигнализацию (Johnston, R. J. *et al.*, 2014, выше), что напоминает функцию CTLA-4 по уравниванию костимулирующей функции CD28 (Egen, J. G. *et al.*, 2002. *Nature immunology* 3: 611-618.).

[004] В случае рака TIGIT, как известно, положительно регулируется инфильтрирующими опухоль Т-клетками, принимая во внимание, что CD155 экспрессируется с высокими уровнями как опухолями человека и мыши, так и инфильтрирующими опухоль миелоидными клетками (Martinet, L., and M. J. Smyth. 2015. *Nat Rev Immunol* 15: 243-254; Chan, C. J. *et al.*, 2014. *Nature immunology* 15: 431-438; Blake, S. J. *et al.*, 2016. *Clinical cancer research* 22: 5183-5188; Li, X. Y. *et al.*, 2018. *J Clin Invest* 128: 2613-2625; Kurtulus, S. *et al.*, 2015. *J Clin Invest* 125: 4053-4062). Было предположено, что TIGIT может ингибировать противоопухолевые иммунные ответы за счет нескольких последовательных этапов (Manieri, N. A. *et al.*, 2017. *Trends Immunol* 38: 20-28): сначала ингибирования опосредуемого NK-клетками уничтожения опухолевых клеток, а также высвобождения опухолевых антигенов; затем индукции толерогенных дендритных клеток и подавления функции CD8⁺ Т-клеток за счет TIGIT⁺ Treg; и, наконец, прямого ингибирования эффекторных функций CD8⁺ Т-клеток, что в конечном итоге предотвращает устранение раковых клеток. Таким образом, TIGIT считается ключевым ингибитором иммунитета к раку (Manieri, N. A. *et al.*, 2017, выше; Dougall, W. C. *et al.*, 2017. *Immunol Rev* 276: 112-120), и нацеливание на TIGIT рассматривается как перспективный подход к разработке иммунотерапевтических средств против рака.

[005] Антитела к TIGIT продемонстрировали терапевтические эффекты в нескольких моделях рака на мышах, и в настоящее время несколько антител проходят оценку в клинических исследованиях с участием людей (Burugu, S. *et al.*, 2018. *Semin Cancer Biol* 52: 39-52.). Несмотря на эти многообещающие медицинские результаты, научное понимание механизма(ов), посредством которого(ых) эти антитела к TIGIT оказывают свое противоопухолевое действие, остается неясным, что ограничивает усилия по разработке более эффективных антител или комбинаций, а также клинические усилия по определению того, какие популяции пациентов могут получить пользу от такого лечения.

[006] Соответственно, по-прежнему необходимы усилия для изучения механизма,

лежащего в основе функции антител к TIGIT, с целью разработки улучшенных антител к TIGIT, подходящих для терапевтического применения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[007] Все ссылки, включая научные публикации, публикации заявок на патент и публикации патентов, включены в настоящую заявку в полном объеме для всех целей.

[008] Панель моноклональных антител человека с блокирующей активностью против взаимодействия TIGIT и CD155 была идентифицирована путем перекрестного отбора и скрининга большой библиотеки фагового дисплея антител с использованием внеклеточного домена (BKД) как TIGIT человека (hTIGIT-BKД; Uniprot ID Q495A1), так и TIGIT мыши (mTIGIT-BKД; Uniprot ID P86176) в качестве мишеней. Антитело T4 и антитело hm7 показали более высокую аффинность связывания среди указанных антител как с hTIGIT, так и с mTIGIT, и лучшую блокирующую активность, чем другие антитела. Оптимизация как антитела T4, так и антитела hm7 с помощью подхода перестановки цепей привела к более мощным антителам с еще более высокой аффинностью связывания, что представляет собой объект настоящего изобретения. Кроме того, было обнаружено, что антитела к TIGIT согласно настоящей заявке обладают Fc-опосредуемыми эффекторными функциями в дополнение к их функции блокирования связывания TIGIT с его лигандом. Кроме того, также было обнаружено, что антитела к TIGIT согласно настоящей заявке способны индуцировать эффект перекрестной защиты и долговременной иммунной памяти, что делает их подходящими для терапевтического применения.

[009] Согласно первому аспекту настоящего изобретения предложено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается как с TIGIT человека (hTIGIT), так и с TIGIT мыши (mTIGIT). Согласно одному варианту реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(1) переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий HCDR1 (определяющий комплементарность участок тяжелой цепи 1), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; и/или переменный домен легкой цепи (VL),

содержащий LCDR1 (определяющий комплементарность участок легкой цепи 1), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11;

(2) переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; и/или переменный домен легкой цепи (VL), содержащий LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, и LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25;

(3) переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; и/или переменный домен легкой цепи (VL), содержащий LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, и LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32;

(4) переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; и/или переменный домен легкой цепи (VL), содержащий LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; или

(5) переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; и/или переменный домен легкой цепи (VL), содержащий LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15,

LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.

[0010] Согласно более конкретному варианту реализации выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается как с TIGIT человека (hTIGIT), так и с TIGIT мыши (mTIGIT), содержит

(1) переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности SEQ ID NO: 8; и/или переменный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности SEQ ID NO: 12;

(2) переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности SEQ ID NO: 27; и/или переменный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности SEQ ID NO: 26; или

(3) переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности SEQ ID NO: 34; и/или переменный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности SEQ ID NO: 33.

[0011] Согласно одному варианту реализации выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается как с TIGIT человека (hTIGIT), так и с TIGIT мыши (mTIGIT), содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; и/или переменный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

[0012] Согласно более конкретному варианту реализации выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается как с TIGIT человека (hTIGIT), так и с TIGIT мыши (mTIGIT), содержит

(1) переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; и/или переменный домен легкой цепи (VL),

содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12;

(2) переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27; и/или переменный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26;

(3) переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34; и/или переменный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33;

(4) переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; и/или переменный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; или

(5) переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22; и/или переменный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21.

[0013] Согласно более конкретному варианту реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит

(1) переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и переменный домен легкой цепи, показанный на Фиг. 6, антитела, выбранного из группы, состоящей из IGKV1-39, T4, 1-44, 1-48, 1-60, 1-66, 1-93, 3-5, 3-12, 3-17, 3-96 и T4M;

(2) переменный домен тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей изIGHV3-23,IGHV3-30, hm7, hm7-3-23 и hm7-3-30, показанных на Фиг. 10, и переменный домен легкой цепи, показанный на Фиг. 9, антитела, выбранного из группы, состоящей из IGLV2-11, IGLV2-14, hm7, Tm1, Tm3, Tm4, Tm5, Tm6, Tm7, Tm8, Tm9, Tm10, Tm11, Tm12, Tm13, Tm14, Tm15, Tm17, Tm18, Tm19, CS19, CS19ME и CS19ME-N.

[0014] Согласно одному варианту реализации антитело к TIGIT представляет собой антитело человека. Согласно одному варианту реализации антитело к TIGIT представляет собой моноклональное антитело человека (MAT).

[0015] Согласно одному варианту реализации антитело к TIGIT представляет собой Fab, F(ab')₂, Fv, одноцепочечный Fv (scFv) или содержится в виде домена в биспецифичном или триспецифичном антителе.

[0027] Согласно одному варианту реализации антитело к TIGIT содержит константную область тяжелой цепи подклассов IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или ее вариант, а также константную область легкой цепи каппа- или лямбда-типа или ее вариант. Согласно предпочтительному варианту реализации антитело к TIGIT содержит константную область тяжелой цепи IgG1.

[0028] Согласно одному варианту реализации антитело к TIGIT представляет собой выделенное антитело. Согласно одному варианту реализации антитело к TIGIT представляет собой рекомбинантное антитело.

[0029] Согласно одному варианту реализации антитело к TIGIT согласно настоящей заявке обладает Fc-опосредуемой эффекторной функцией. Согласно одному предпочтительному варианту реализации антитело к TIGIT согласно настоящей заявке обладает повышенной Fc-опосредуемой эффекторной функцией.

[0030] Согласно одному варианту реализации антитело к TIGIT согласно настоящей заявке дополнительно модифицировано путем изменения области Fc таким образом, чтобы (1) усилить функцию АЗКЦ, (2) усилить функцию АЗКФ; и/или (3) уменьшить или устранить функцию КЗЦ по сравнению с антителом без такой модификации. Предпочтительно Fc-модифицированный вариант антитела к TIGIT согласно настоящей заявке имеет усиленную функцию АЗКЦ, усиленную функцию АЗКФ и уменьшенную или отсутствующую функцию КЗЦ по сравнению с антителом к TIGIT согласно настоящей заявке до модификации.

[0031] Согласно одному варианту реализации антитело к TIGIT согласно настоящей заявке представляет собой афукозилированное антитело. Согласно одному варианту реализации афукозилированное антитело обладает повышенными эффекторными функциями по сравнению с его фукозилированным аналогом.

[0032] Согласно одному варианту реализации антитело к TIGIT согласно настоящей заявке индуцирует эффект иммунной памяти. Согласно более конкретному варианту реализации эффект иммунной памяти, индуцированный антителом к TIGIT согласно настоящей заявке, создает перекрестный противоопухолевый иммунитет.

[0033] Согласно второму аспекту настоящего изобретения предложена композиция, например, фармацевтическая композиция, содержащая антитело к TIGIT или антигенсвязывающий фрагмент согласно первому аспекту настоящей заявки, а также

фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. Согласно предпочтительному варианту реализации фармацевтическая композиция содержит терапевтически эффективное количество антитела к TIGIT или антигенсвязывающего фрагмента.

[0034] Согласно третьему аспекту настоящего изобретения предложен набор, содержащий антитело к TIGIT или антигенсвязывающий фрагмент согласно первому аспекту настоящей заявки, или композицию согласно второму аспекту настоящей заявки. Согласно предпочтительному варианту реализации набор содержит терапевтически эффективное количество антитела к TIGIT или антигенсвязывающего фрагмента.

[0035] Согласно четвертому аспекту настоящего изобретения предложен способ предотвращения или лечения иммуноопосредованного состояния или заболевания, включающий введение субъекту, нуждающемуся в нем, терапевтически эффективного количества антитела к TIGIT или антигенсвязывающего фрагмента согласно первому аспекту настоящей заявки, или фармацевтической композиции согласно второму аспекту настоящей заявки. Согласно конкретному варианту реализации иммуноопосредованное состояние или заболевание представляет собой рак или вирусную инфекцию, такую как хроническая вирусная инфекция.

[0036] Согласно пятому аспекту настоящего изобретения предложен способ предотвращения рецидива иммуноопосредованного состояния или заболевания, такого как рак, включающий введение субъекту, нуждающемуся в нем, терапевтически эффективного количества антитела к TIGIT или антигенсвязывающего фрагмента согласно первому аспекту настоящей заявки, или фармацевтической композиции согласно второму аспекту настоящей заявки. Согласно конкретному варианту реализации заболевание или нарушение представляет собой рак.

[0037] Согласно шестому аспекту настоящего изобретения предложено применение антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно первому аспекту настоящей заявки или фармацевтической композиции согласно второму аспекту настоящей заявки для лечения различных состояний или заболеваний, описанных в данном документе, или для предотвращения рецидива различных состояний или заболеваний, описанных в данном документе.

[0038] Согласно седьмому аспекту настоящего изобретения предложено применение

антитела к TIGIT или антигенсвязывающего фрагмента согласно первому аспекту настоящей заявки или фармацевтической композиции согласно второму аспекту настоящей заявки в изготовлении лекарственного средства для лечения различных состояний или заболеваний, описанных в данном документе, или для предотвращения рецидива различных состояний или заболеваний, описанных в данном документе.

[0039] Согласно восьмому аспекту настоящего изобретения предложена выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело к TIGIT или фрагмент согласно первому аспекту. Согласно более конкретному варианту реализации этого аспекта выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело к TIGIT или его фрагмент, содержит

(1) нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 14, и/или нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 13;

(2) нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 29, и/или нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 28; или

(3) нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 36, и/или нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 35.

[0040] Согласно девятому аспекту настоящего изобретения предложен вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту согласно восьмому аспекту.

[0041] Согласно десятому аспекту настоящего изобретения предложена клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту согласно восьмому аспекту или вектор экспрессии согласно девятому аспекту.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0042] На **ФИГ. 1** показано выравнивание аминокислот hTIGIT-ВКД (внеклеточный домен TIGIT человека) и mTIGIT-ВКД (внеклеточный домен TIGIT мыши), в котором точки обозначают положения, имеющие идентичные аминокислотные остатки.

[0043] На **ФИГ. 2А–В** показано связывание антител к TIGIT с hTIGIT и mTIGIT. **А)** Анализ методом проточной цитометрии. **В)** Одноцикловые кинетические анализы с использованием Biacore T200.

[0044] На **ФИГ. 3А–В** показана активность связывания и конкуренции с лигандом антител к TIGIT, проанализированная с помощью ИФА. **А)** Связывание антител T4 и hm7 с очищенными белками TIGIT-ВКД. **В)** Анализы конкуренции с лигандами антител T4 и hm7.

[0045] На **ФИГ. 4А–В** показана кинетика связывания антител к TIGIT с hTIGIT или mTIGIT по данным SPR. **А)** Многоцикловые кинетические анализы взаимодействия между антителами к TIGIT (T4 и hm7) и hTIGIT или mTIGIT с использованием Biacore T200. **В)** Таблица, в которой перечислены значения k_a , k_d и K_D .

[0046] На **ФИГ. 5А–В** показаны анализы связывания T4 и антител к TIGIT, полученных из T4, с hTIGIT и mTIGIT с использованием ИФА и SPR. **А)** Анализы связывания антител к TIGIT с очищенными белками TIGIT-ВКД (биотинилированный hTIGIT-ВКД или mTIGIT-ВКД). **В)** Одноцикловые кинетические анализы взаимодействий между антителами к TIGIT и hTIGIT или mTIGIT с использованием Biacore T200.

[0047] На **ФИГ. 6** показано выравнивание аминокислотной последовательности VL вариантных антител, полученных из T4, и последовательности зародышевой линии. Точки обозначают положения, имеющие идентичные аминокислоты. Нумерация аминокислот основана на консенсусной последовательности. CDR определены в соответствии с системой Kabat и затенены серым цветом.

[0048] На **ФИГ. 7А–В** показана кинетика связывания антител T4 и T4М с hTIGIT и mTIGIT по данным SPR. **А)** Многоцикловые кинетические анализы взаимодействий между антителами к TIGIT и hTIGIT или mTIGIT с использованием Biacore T200. **В)** Таблица, в которой перечислены значения k_a , k_d и K_D .

[0049] На **ФИГ. 8А–В** показана кинетика связывания антител к TIGIT (полученные из hm7 антитела, hm7 и T4) с hTIGIT (А) или mTIGIT (В) по данным SPR.

[0050] На **ФИГ. 9** показано выравнивание аминокислотной последовательности VL вариантов, полученных из антитела hm7. Точки обозначают положения, имеющие идентичные аминокислоты. Нумерация аминокислот основана на консенсусной последовательности. CDR определены в соответствии с системой Kabat и затенены серым цветом.

[0051] На **ФИГ. 10** показано выравнивание аминокислотных последовательностей VH вариантов, полученных из антитела hm7. Точки обозначают положения, имеющие идентичные аминокислоты. Нумерация аминокислот основана на консенсусной

последовательности. CDR определены в соответствии с системой Kabat и затенены серым цветом.

[0052] На **ФИГ. 11А–В** показана кинетика связывания антител к TIGIT с hTIGIT или mTIGIT по данным SPR. **А)** Многоцикловые кинетические анализы взаимодействий между антителами к TIGIT и hTIGIT или mTIGIT с использованием T200. **В)** Таблица, в которой перечислены значения k_a , k_d и KD .

[0053] На **ФИГ. 12А–С** показано картирование эпитопов антител к TIGIT. **А)** Выравнивание аминокислотных последовательностей N-концевых доменов IgV hTIGIT, mTIGIT, hCD155, трех химер hTIGIT/hCD155 и трех вариантов hTIGIT. Точки обозначают положения, имеющие идентичные аминокислоты, а тире указывают на пропуски. Замененные или мутированные области затенены серым цветом. Нумерация аминокислот основана на hTIGIT. **В)** Анализ методом проточной цитометрии связывания различных антител или лиганда hCD155-hFc с клетками CHO, временно экспрессирующими полноразмерный hTIGIT (дикий тип, WT) или его химеры, или варианты. В качестве отрицательного контроля использовали окрашивание только вторичным антителом (отрицательный контроль). Уровни экспрессии на клеточной поверхности WT hTIGIT, химер и вариантов оценивали с использованием МАТ (GC33), распознающего N-концевую метку. **С)** Анализ методом проточной цитометрии связывания различных антител или лиганда hCD155-hFc с клетками 293Т, временно экспрессирующими полноразмерный hTIGIT (дикий тип, WT) или три его варианта (S78A, S80A, K82A). В качестве отрицательного контроля использовали окрашивание только вторичным антителом (отрицательный контроль). Уровни экспрессии на клеточной поверхности WT hTIGIT и вариантов оценивали с использованием hCD155-hFc.

[0054] На **ФИГ. 13А–С** показана активность конкуренции антитела к TIGIT с лигандом, проанализированная с помощью ИФА. Антитело CS19ME3-30-N в форме hIgG1 в серийно разведенных концентрациях тестировали на конкуренцию за связывание hCD155-mFc (**А**), mCD155-mFc (**В**) или hCD112 (**С**) с биотинилированным hTIGIT, mTIGIT или hTIGIT, захваченным иммобилизованным стрептавидином на планшете для ИФА.

[0055] На **ФИГ. 14А–С** показано, что антитела к TIGIT эффективно восстанавливают цитотоксичность NK-клеток, подавляемую взаимодействием TIGIT-CD155. **А–В)** Экспрессию hTIGIT на YTS-hTIGIT или hCD155 на стабильной клеточной линии 721.221-hCD155 оценивали с использованием антитела к TIGIT (10A7) или слитого белка hTIGIT-Fc с помощью проточной цитометрии. **С)** Взаимодействие TIGIT/CD155 нарушало цитотоксичность клеток YTS (слева) и антитела T4, CS19ME3-23 и CS19ME3-30-N

эффективно восстанавливали цитотоксичность NK-клеток, подавляемую взаимодействием TIGIT-CD155 (посередине и справа). Для анализов уничтожения клеток-мишеней 721.221 эффекторными NK-клетками YTS и уничтожения клеток 721.221-hCD155 клетками YTS-hTIGIT соотношения эффектор:мишень (Э:М) указаны на оси x. Для анализов уничтожения в присутствии антител соотношение Э:М составляло 2:1. Антитело 10A7 было включено в качестве референсного контрольного антитела для антитела к TIGIT. Антитела представляли собой полноразмерные антитела hIgG1.

[0056] На **ФИГ. 15А-Е** показаны эффекторные функции АЗКЦ, индуцированные антителами к TIGIT согласно настоящей заявке. **А)** Клеточные линии Raji-hTIGIT были созданы для Fc-опосредуемого эффекторного функционального анализа *in vitro*. Экспрессию hTIGIT на клетках Raji WT и Raji-hTIGIT анализировали с помощью FACS. **В)** Эффекторная функция АЗКЦ, индуцированная антителами Т4. Активность АЗКЦ измеряли с использованием репортерной аналитической системы. В качестве эффекторных клеток использовали Jurkat-NFAT-Luc2p/mFcγRIV (Jurkat-mFcγRIV) или Jurkat-NFAT-Luc2p/hFcγRIII (Jurkat-hFcγRIII), и в качестве клеток-мишеней использовали клетки Raji-hTIGIT, соответственно. Антитела тестировали в указанных концентрациях с тремя повторами. Соотношение Э:М составляло 6:1. **С-Д)** Эффекторная функция АЗКЦ, индуцированная CS19ME3-23 (**С**) или CS19ME3-30-N (**Д**) в форматах hIgG или mIgG. Функцию АЗКЦ детектировали в соответствии со способом, описанным на панели В, в среде, содержащей 0,1 мкг/мл антител. **Е)** Эффекторная функция АЗКЦ, индуцированная hIgG и афукозилированными вариантами hIgG1. Метод детектирования был аналогичен методу, описанному на панели В.

[0057] На **ФИГ. 16А-С** показаны эффекторные функции АЗКФ, индуцированные антителами к TIGIT посредством макрофагов. Клетки-мишени Raji-hTIGIT метили флуоресцентным красителем CFSE перед смешиванием с макрофагами, полученными из костного мозга мыши, окрашенными антителом F4/80-Alexa Fluor 633. Соотношение Э:М составляло 1:2. Активность АЗКФ отслеживали с помощью флуоресцентной микроскопии. Индекс фагоцитоза определяли как число CFSE-положительных клеток-мишеней на 100 макрофагов. Выполняли детектирование ответов АЗКФ, опосредуемых антителами Т4 mIgG (**А**), антителами CS19ME3-30-N mIgG (**В**) или антителами hIgG (**С**). («ns»: недостоверно; ****P<0,0001).

[0058] На **ФИГ. 17А-Д** показаны эффекторные функции КЗЦ, индуцированные антителами к TIGIT. Клетки-мишени Raji-hTIGIT инкубировали с антителами к TIGIT в присутствии 5% сывороточного компонента кролика. Активность КЗЦ измеряли с

использованием высвобождения лактатдегидрогеназы (ЛДГ) с тремя повторами. Антитела тестировали при 15–20 мкг/мл. Выполняли детектирование ответов КЗЦ, опосредуемых антителами Т4 mIgG (**A**), антителами CS19ME3-23 mIgG (**B**) или антителами hIgG (**C** и **D**). («ns»: недостоверно; **** $P < 0,0001$).

[0059] На **ФИГ. 18A–F** показана мощная противоопухолевая активность антител к TIGIT, зависящая от Fc-опосредуемых эффекторных функций, в моделях на мышах. **A**) Экспрессия mCD155 на клеточных линиях CT26, A20 или 4T1. **B–C**) Противоопухолевая активность CS19ME3-30-N-mIgG2a, T4-hIgG1 или T4-mIgG2a в моделях опухолей CT26. **D**) Противоопухолевая активность T4-mIgG2a в моделях опухолей A20 или 4T1. **E–F**) Противоопухолевая активность антитела Т4 или CS19ME3-23 и их вариантов Fc в моделях опухолей CT26 и A20. Временные точки введения антитела отмечены стрелками. Объемы опухолей представлены как среднее значение $\pm$ СОС.

[0060] На **ФИГ. 19A–D** показаны результаты для фармакокинетического профиля антител к TIGIT у мышей. **A–B**) Показан профиль зависимости логарифма концентрации антитела в сыворотке от времени для однократного введения антител Т4 (**A**) или CS19ME3-23 (**B**) (10 мг/кг) у мышей BALB/c. **C–D**) Показан профиль зависимости концентрации антитела в сыворотке от времени для однократного введения антитела CS19ME3-30-N-hIgG1 (5 мг/кг) у мышей C57 WT (**C**) или C57-hFcRn (**D**). Данные представлены как средние значения $\pm$ СОС.

[0061] На **ФИГ. 20A–K** показаны результаты исследований с истощением из Примера 9. **A**) Т-клетки необходимы для оптимального терапевтического эффекта антитела Т4. Противоопухолевый эффект антитела Т4 при лечении опухоли CT26 сравнивали у мышей линии BALB/c ($n=5$ /группу) и мышей линии Nude ($n=6$ /группу). **B–K**) Эффект селективного истощения иммунных клеток на терапевтическую эффективность антитела Т4 при лечении опухоли CT26 или A20. CD4-истощающие антитела (клон GK1.5) или CD8-истощающие антитела (клон 2.43) использовали для истощения CD4⁺ или CD8⁺ Т-клеток. Для истощения NK-клеток, нейтрофилов или макрофагов использовали поликлональное антитело к асиало-GM1 (Poly21460), антитело к Ly6G (клон 1A8) или липосомы с клодронатом (FormuMax), соответственно. Черные стрелки указывают на введение истощающих антител или липосом с клодронатом. На лечение антителом Т4 (10 мг/кг) указывают серые стрелки. Показаны объемы опухолей с течением времени ($n=4–6$ /группу).

[0062] На **ФИГ. 21A–B** показана иммунная память, индуцированная лечением антителами к TIGIT согласно настоящей заявке. **A**) Мышей, несущих опухоль CT26, излеченных путем введения антитела Т4, повторно иммунизировали CT26, A20 или 4T1. Стрелки указывают

момент времени повторной иммунизации. Подобранных по возрасту наивных мышей включали в качестве контролей. n=3–5/группу. **В)** Мышей, несущих опухоль A20, излеченных путем введения антитела T4, повторно иммунизировали A20, CT26 или 4T1. Исследование выполняли аналогично тому, как описано на панели А.

[0063] На **ФИГ. 22** показан противоопухолевый эффект антитела к TIGIT (CS19ME3-30-N-hIgG1-афуко) в различных дозах. Временные точки дозирования отмечены стрелками. Объемы опухолей представлены как среднее значение $\pm$ СОС.

[0064] На **ФИГ. 23А-С** показан синергический противоопухолевый эффект антител к TIGIT и антитела к PD-1 (или антитела к PD-L1). **А)** Сравнение противоопухолевого эффекта у мышей C57, несущих MC38, полученное с контрольной группой без лечения, группой лечения антителом к TIGIT (CS19ME3-30-N-mIgG2a, 10 мг/кг), группой лечения антителом к mPD-1 (RMP1-14, 3 мг/кг) и группой комбинированного лечения. **В) и С)** Сравнение противоопухолевого эффекта у мышей BALB/c, несущих CT26, рандомизированных в следующие группы на основании сходных средних объемов опухолей CT26 (120-270 мм³): контрольная группа без лечения, группа лечения антителом к TIGIT (CS19ME3-30-N-hIgG1-афуко, 1 мг/кг), группа лечения антителом к mPD-1 (RMP1-14, 5 мг/кг) или собственная группа лечения антителом к mPD-L1 (mP4, 10 мг/кг) и группа комбинированного лечения. Временные точки лечения антителом отмечены стрелками. Объемы опухолей представлены как среднее значение $\pm$ СОС.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определения

[0065] Если определение не было дано специально в данном документе, все иные технические и научные термины, используемые в настоящей заявке, имеют значение, как правило, понятное среднему специалисту в области техники, к которой принадлежит данное изобретение.

[0066] В настоящей заявке, включая прилагаемую формулу изобретения, формы единственного числа слов (соотв. «**a**», «**an**» и «**the**» в исходном тексте на английском языке), включают их эквиваленты во множественном числе, если иное явным образом не следует из контекста.

[0067] Термин «**или**» используется для обозначения и используется взаимозаменяемо с термином «**и/или**», если контекст явно не диктует иное.

[0068] В контексте настоящего открытия, если не указано иное, формулировка

«содержит» и ее вариации, такие как «содержащий», будут пониматься как подразумевающие включение указанного элемента, например аминокислотной последовательности, нуклеотидной последовательности, свойства, стадия или их группа, но не исключение любых других элементов, например аминокислотных последовательностей, нуклеотидных последовательностей, свойств и этапов. При использовании в данном документе термин «содержать» или его любой вариант может быть заменен термином «включать» или иногда «иметь» или его эквивалентным вариантом. Согласно определенным вариантам реализации формулировка «содержать» также включает сценарий «состоящий из».

Антитело и его антигенсвязывающий фрагмент

[0069] Если не указано иное, термин «**антитело**» или «**АТ**» в контексте настоящего изобретения охватывает антитела, а также фрагменты антител в самом широком смысле, при условии, что оно распознает и связывается с TIGIT человека или TIGIT мыши. Антитело согласно настоящей заявке, в целом, относится к моноспецифичному антителу. Но в данной заявке также рассматривается антитело с гетерологической специфичностью (гетероспецифичное) или мультиспецифичное антитело. Термины «**фрагмент антитела**» и «**антигенсвязывающий фрагмент**» являются взаимозаменяемыми и обозначают часть полноразмерного антитела, обычно содержащую связывающий или переменный участок для антигена. К примерам фрагментов антител можно отнести фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv; димеры; линейные антитела; молекулы одноцепочечных антител; и мультиспецифичные антитела, образованные из фрагментов антител.

[0070] Под «**специфичным связыванием**» или «**специфичным связыванием с**» понимается, что антитело демонстрирует преимущественное связывание с определенной мишенью по сравнению с другими белками, но эта специфичность не требует абсолютной специфичности связывания. Антитело считается «специфичным» по отношению к мишени, если его связывание определяет присутствие целевого белка в образце, т.е. без получения нежелательных результатов, таких как ложноположительный. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящей заявке будет связываться с целевым белком с аффинностью, которая по меньшей мере в 2 раза выше, предпочтительно по

меньшей мере в 10 раз выше, более предпочтительно по меньшей мере в 20 раз выше и наиболее предпочтительно по меньшей мере в 100 раз выше, чем аффинность в отношении нецелевых белков. Альтернативно или дополнительно, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению будет иметь аффинность связывания с его целевым белком, в частности, как с hTIGIT, так и с mTIGIT, представленную значением KD ниже 1×10^{-7} M, ниже 1×10^{-8} M, ниже 1×10^{-9} M (1 нМ), ниже 1×10^{-10} M, ниже 1×10^{-11} M или даже ниже 1×10^{-12} M (1 пМ).

[0071] Термин **«антитело человека»** в контексте данного документа обозначает антитело, которое содержит только белковые последовательности иммуноглобулинов человека. Антитело человека может содержать мышинные углеводные цепи, если оно продуцируется в организме мыши, в клетке мыши или в гибридоме, полученной из клетки мыши. Аналогичным образом, **«мышинное антитело»** обозначает антитело, содержащее только белковые последовательности иммуноглобулинов мыши или крысы, соответственно.

[0072] Антитело согласно настоящей заявке, специфично связывающееся с TIGIT человека, также показывает перекрестную реактивность с мышинным ортологом TIGIT человека. Термин **«перекрестная реактивность»** в контексте данного документа относится к способности антитела вступать в реакцию с гомологичным или ортологичным белком, полученным из другого вида. Перекрестная реактивность антитела может быть определена с использованием любого метода, известного в данной области техники. Например, она может быть определена путем измерения аффинности связывания с помощью поверхностного плазмонного резонанса (например, BIACORE) или подобной методики (например, KinExa или OCTET).

[0073] Антитело согласно настоящей заявке можно подвергнуть способу очистки для удаления нежелательных материалов, что приведет к получению очищенного антитела. Обычные методы очистки антител включают, но не ограничиваются ими, методы колоночной хроматографии, которые хорошо известны в данной области.

[0074] Антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящей заявке может быть выделенным антителом. Под термином **«выделенный»** понимается то, что антитела или антигенсвязывающие фрагменты, по меньшей мере, частично свободны от других биологических материалов или небиологических материалов из клеток, культур клеток,

питательной среды, системы экспрессии, в которой они продуцируются. Указанные материалы могут включать нуклеиновые кислоты, белки, липиды, углеводы, буфер, соль и другой материал, такой как продукты распада клеток и ростовая среда.

[0075] Настоящая заявка также предусматривает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий одну или более консервативных замен, при условии, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается с hTIGIT и mTIGIT и обладает по меньшей мере одним из свойств антитела, описанного в данном документе. **«Консервативные замены»** аминокислот хорошо известны в данной области техники и обычно относятся к замене одного аминокислотного остатка другим аминокислотным остатком, имеющим сходную боковую цепь по структуре или функции.

[0076] В настоящей заявке консенсусную аминокислотную последовательность, например, варибельной области или CDR, определяют путем выравнивания нескольких последовательностей родственных антител согласно настоящей заявке и идентификации наиболее часто представленного остатка в каждом положении. В результате консенсусная последовательность имеет высокую гомологию последовательности со специфичными антителами согласно настоящей заявке, которые используются для выравнивания. Можно предположить, что антитело, содержащее варибельные области или CDR, отличные от консенсусной последовательности только по несколькими аминокислотам (менее 30%, менее 25%, менее 20%, менее 15% или менее 10% аминокислот всей последовательности), в частности, в варибельных положениях, как показано в выравниваниях, может иметь свойства, сходные с таковыми специфичных антител, участвующих в выравнивании, и также должно быть охвачено настоящей заявкой.

[0077] Настоящая заявка также обеспечивает последовательность выделенной нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело или его фрагмент. Под терминами **«выделенная нуклеиновая кислота»** или **«выделенный полинуклеотид»** понимается ДНК или РНК, которая удалена из всего или части полинуклеотида, в котором выделенный полинуклеотид встречается в природе, или связана с полинуклеотидом, с которым она не связана в естественных условиях. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты **«содержащая»** конкретную нуклеотидную последовательность может включать, помимо указанной последовательности,

функционально связанные регуляторные последовательности, которые контролируют экспрессию кодирующей области указанных последовательностей нуклеиновых кислот. Специалист в данной области техники может понять, что конкретная аминокислотная последовательность может кодироваться разными нуклеотидными последовательностями вследствие вырожденности кодонов.

[0078] «Эффекторная функция», в частности, «Fc-опосредуемая эффекторная функция» относится к эффектам в результате взаимодействия или связывания области Fc антитела с рецепторами Fc и включает, например, связывание с C1q на комплексе C1, комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ), FcγR-опосредуемые эффекторные функции, такие как антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ) и антителозависимый клеточно-опосредуемый фагоцитоз (АЗКФ). Антитело согласно настоящей заявке может иметь эффекторные функции или может не иметь эффекторной функции.

[0079] Как известно в данной области техники, эффекторные функции антитела можно модулировать путем изменения аминокислотной последовательности или посттрансляционных модификаций Fc и/или константной области антитела. Было обнаружено, что вариант mIgG2a-DLE антитела согласно настоящей заявке (Т4 или CS19ME3-23) показал улучшенный противоопухолевый эффект по сравнению с антителом, имеющим mIgG2a дикого типа. Вариант mIgG2a-DLE показал функции АЗКЦ и АЗКФ при отсутствии функции КЗЦ. Соответственно, в предпочтительном варианте реализации настоящая заявка относится к антителу согласно первому аспекту с функциями АЗКЦ и/или АЗКФ, но без функции КЗЦ, или к варианту Fc антитела согласно первому аспекту с усиленными функциями АЗКЦ и/или АЗКФ, а также уменьшенной или отсутствующей функцией КЗЦ.

[0080] В контексте настоящей заявки под «**иммунной памятью**» или «**иммунологической памятью**» подразумевается, что иммунная система установила иммунитет к определенным проблемам, так что она может эффективно отвечать на последующую проблему при ее возникновении. Согласно конкретным вариантам реализации настоящей заявки иммунная память, созданная антителом к TIGIT согласно настоящей заявке, означает, что введение антитела не только уменьшает опухоль или рак, но и защищает субъекта от вторичной или рецидивирующей опухоли или рака. Более

предпочтительно иммунная память, индуцированная антителами к TIGIT согласно настоящей заявке, обеспечивает перекрестную защиту от различных типов рака. Иными словами, когда антитело применяют для лечения одной опухоли, устанавливается перекрестная защитная иммунная память, которая защищает субъекта от развития другой опухоли, которая также чувствительна к антителу согласно настоящей заявке.

Применение в терапевтических целях

[0081] Согласно настоящему изобретению предложен способ предотвращения, лечения или предотвращения рецидива иммуноопосредованного заболевания, такого как разные виды рака и вирусная инфекция, например, хроническая вирусная инфекция, включающий введение субъекту, нуждающемуся в нем, терапевтически эффективного количества антитела к TIGIT или антигенсвязывающего фрагмента согласно первому аспекту настоящей заявки, или фармацевтической композиции согласно второму аспекту настоящей заявки.

[0082] Термин **«терапевтически эффективное количество»** в контексте данного документа относится к количеству антитела, которое при введении субъекту для лечения заболевания или по меньшей мере одного из клинических симптомов заболевания или нарушения, является достаточным для осуществления такого лечения заболевания, нарушения или симптома. **«Терапевтически эффективное количество»** может варьировать в зависимости от антитела, заболевания и/или симптома заболевания, тяжести заболевания и/или симптомов, возраста субъекта, получающего лечение, а также массы субъекта, получающего лечение. Подходящее количество в любом конкретном случае может быть очевидным для специалистов в данной области или может быть определено с помощью рутинных опытов. В случае комбинированной терапии **«терапевтически эффективное количество»** относится к общему количеству комбинируемых объектов для эффективного лечения заболевания, нарушения или состояния.

[0083] В контексте настоящей заявки под **«субъектом»** понимается животное, предпочтительно млекопитающее, т.е. примат, предпочтительно высший примат, например, человек.

[0084] Термины **«рак»** или **«опухоль»** в данном контексте означают или описывают

физиологическое состояние у млекопитающих, которое обычно характеризуется нерегулируемым ростом клеток. Разные виды рака, которые можно лечить с помощью антитела согласно настоящей заявке, включают как солидную опухоль, так и гематологическое злокачественное новообразование, например, рак молочной железы, лимфому и колоректальный рак.

[0085] Антитело к TIGIT согласно настоящей заявке можно применять в комбинации с дополнительным терапевтическим агентом, включая, но не ограничиваясь перечисленными, антитело к PD-1, антитело к PD-L1, антитело к LAG3, антитело к TIM3, антитело к OX40 и антитело к CTLA4.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Создание антител к TIGIT

[0086] Этот пример описывает создание антител к TIGIT согласно настоящей заявке на основании скрининга библиотеки.

Антигенные мишени - TIGIT-ВКД и mTIGIT-ВКД

[0087] Внеклеточный домен (ВКД) hTIGIT и mTIGIT использовали в качестве мишеней для скрининга библиотеки. Оба ВКД экспрессировали в виде биотинилированных рекомбинантных слитых белков. Выравнивание последовательностей hTIGIT-ВКД и mTIGIT-ВКД показано на Фиг. 1.

Библиотека фагового дисплея антител

[0088] Библиотеку неиммунного scFv антител человека (одноцепочечного варибельного фрагмента) конструировали из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) 93 здоровых доноров. Размер библиотеки составил в общей сложности $1,1 \times 10^{10}$ членов (Li D, et al. A potent human neutralizing antibody Fc-dependently reduces established HBV infections. Elife 2017;6).

Отбор и скрининг фаговой библиотеки антител

[0089] Фаговые частицы, экспрессирующие scFv на своей поверхности (фаг-scFv), получали из библиотеки и использовали для отбора фагов-scFv против очищенных антигенов. Для первого раунда отбора биотинилированный белок hTIGIT-ВКД захватывали

на магнитных гранулах M-280 Dynabeads[®], конъюгированных со стрептавидином (Life Technologies), а затем инкубировали с 1×10^{13} фаговых частиц, полученных из библиотеки. Для второго раунда отбора белок hTIGIT-ВКД-биотин или mTIGIT-ВКД-биотин захватывали на M-280 Dynabeads и инкубировали с фаговыми частицами, полученными в первом раунде отбора. Для каждого раунда отбора с целью получения высокоаффинных антител количество антигена, захваченного на магнитных гранулах, оптимизировали и проводили этапы тщательной промывки. Отбор библиотек повторяли дважды независимо.

[0090] Впоследствии отдельные клоны отбирали и сохраняли для получения фагов-scFv в супернатанте бактериальной культуры и скрининга антител со специфичностью связывания как для hTIGIT, так и для mTIGIT с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Клоны, которые перекрестно реагировали с hTIGIT и mTIGIT, отбирали на основании OD450 ($>0,6$ для обоих hTIGIT и mTIGIT). Нуклеотидные последовательности переменных областей тяжелой (VH) и легкой (VL) цепей клонов секвенировали. Их соответствующие аминокислотные последовательности выравнивали для идентификации антител с различными последовательностями для дальнейшей характеристики.

[0091] После 2 раундов отбора примерно 3000 клонов фаг-антитело подвергали скринингу на активность перекрестного связывания как с hTIGIT-ВКД, так и с mTIGIT-ВКД с использованием ИФА, и таким образом получили примерно 100 клонов с активностью перекрестного связывания. Затем их преобразовывали в формат hIgG1 и анализировали на связывание с клетками СНО, экспрессирующими hTIGIT или mTIGIT, с использованием FACS.

Дальнейшая характеристика антител с уникальными последовательностями для идентификации лучших кандидатных антител

[0092] Клоны антител с уникальной последовательностью получали в виде очищенных частиц фага-scFv или полноразмерных IgG1 человека для тестирования их активности связывания с CD155 и конкурентного связывания с CD155 с помощью ИФА, FACS или SPR (поверхностного плазмонного резонанса). На основании результатов этих анализов антитела ранжировали в соответствии с их активностью связывания и конкурентной активностью. Для дальнейшей разработки отобрали антитела с наивысшим рангом.

Получение очищенных фагов-scFv для анализов активности связывания и конкуренции

[0093] Фаги-scFv в супернатанте 10-30 мл бактериальной культуры осаждали с помощью ПЭГ/NaCl, а затем количественно определяли с помощью спектрометра. Фаги-scFv

оценивали на активность связывания TIGIT и активность блокирования взаимодействия между TIGIT и CD155 путем серийного разведения фагов-антител и нормирования к аналогичным концентрациям.

Получение полноразмерного антитела IgG1

[0094] Последовательности, кодирующие VH и VL, scFv отдельно клонировали в вектор экспрессии тяжелой цепи (HC) и вектор экспрессии легкой цепи (LC) антитела. Для получения антитела IgG клетки 293F (Life Technologies) временно котрансфицировали двумя экспрессионными плазмидами (плазмиды HC+LC) в соотношении 1:1. Через 3–5 дней после трансфекции супернатант клеточной культуры собирали для очистки антитела IgG с помощью аффинной хроматографии с белком A (Protein A Sepharose CL-4B, GE Healthcare).

Анализы связывания и конкуренции на основе ИФА

[0095] Для анализа связывания на основе ИФА биотинилированные белковые антигены захватывали на 96-луночных планшетах (Nunc, MaxiSorp™), покрытых стрептавидином (Sigma). Для ИФА на основе фага-scFv добавляли серийно разведенные фаги-scFv, а затем детектировали путем добавления ПХ-конъюгированного мышиного антитела к M13 (GE Healthcare). Сходный способ выполняли для анализов ИФА на основе полноразмерного IgG человека. Связанные антитела детектировали, используя ПХ-конъюгированное мышиное антитело к Fc IgG человека (Thermo Fisher Scientific).

[0096] Конкурентные анализы на основе ИФА выполняли аналогично анализам связывания на основе ИФА, за исключением того, что тестируемые антитела инкубировали с захваченными антигенами в присутствии конкурентных лигандов, CD155 человека и CD155 мыши. В общих чертах, различные антитела IgG1 человека в серийно разведенных концентрациях смешивали с 2 мкг/мл внеклеточного домена hCD155 или mCD155, слитого с Fc-меткой мыши (hCD155-mFc или mCD155-mFc) и добавляли к планшетам для ИФА, чтобы конкурировать за связывание с TIGIT с CD155. Сигнал измеряли путем детектирования лиганда с использованием ПХ-конъюгированного вторичного антитела к IgG мыши (Thermo Fisher Scientific).

Анализы связывания и конкуренции на основе FACS

[0097] В этом анализе использовали клеточные линии CHO (CHO-hTIGIT и CHO-mTIGIT), стабильно экспрессирующие полноразмерный h/mTIGIT. Для конструирования клеточной

линии экспрессионную плазмиду конструировали путем вставки фрагмента ДНК, кодирующего полноразмерный (Uniprot ID Q495A1) или mTIGIT (Uniprot ID P86176), в вектор. Затем экспрессионную плазмиду трансфицировали в клетки CHO с последующей сортировкой методом FACS положительных по окрашиванию 10A7 (антитело к TIGIT, созданное компанией Genetech) популяций для этих стабильных клеточных линий.

[0098] Для анализа связывания на основе FACS клеточные линии CHO-h/mTIGIT инкубировали с различными антителами hIgG1 при 5 мкг/мл в 1% БСА/ФСБ при 4°C в течение 1 часа. Затем клетки промывали три раза ФСБ, содержащим 1% БСА. Связывание антител с клетками детектировали путем добавления FITC-меченого козьего антитела к Fc IgG человека (Pierce-Thermo Fisher Scientific).

Анализ кинетики связывания с помощью технологии поверхностного плазмонного резонанса (SPR)

[0099] Анализы кинетики связывания T4 и вариантов Fc T4 с внеклеточным доменом hTIGIT или mTIGIT выполняли на приборе Biacore T200 (Biacore, GE Healthcare). Антитело к hFc (Thermo Fisher) ковалентно присоединяли к поверхности сенсорного чипа CM5 с использованием набора для связывания по аминокислоте (GE Healthcare). Антитела в оптимальных концентрациях захватывали на чипе, а затем впрыскивали аналиты (hTIGIT или mTIGIT) в определенных концентрациях или в 2-кратно серийно разведенных концентрациях. Кинетики связывания оценивали с использованием модели связывания Ленгмюра 1:1. Скорости ассоциации (k_a), скорости диссоциации (k_d) и константы аффинности (K_D) рассчитывали с использованием программного обеспечения Biacore T200.

[00100] Согласно анализу связывания на основе FACS пять клонов (T4, #18, #43, #45 и hm7) показали высокую аффинность перекрестного связывания как с клетками CHO-hTIGIT, так и с клетками CHO-mTIGIT (Фиг. 2А). Из-за их кинетики связывания как для hTIGIT, так и для mTIGIT в качестве ведущих кандидатов отобрали два самых высокоранговых антитела, антитела T4 и hm7 (Фиг. 2В). Эти два антитела, T4 и hm7, показали специфичное связывание как с hTIGIT, так и с mTIGIT и показали конкурентную активность в отношении TIGIT с его лигандами CD155 в анализах методами ИФА, FACS или SPR (Фиг. 3–4).

Пример 2. Улучшение аффинности связывания T4 путем перестановки цепи VL

[00101] Для дальнейшего улучшения аффинности связывания T4 авторы настоящего изобретения создали библиотеку фагового дисплея с перестановкой цепей VL, в которой VH T4 фиксировали и спаривали с библиотекой различных цепей Vk (вариабельная легкая

каппа-цепь). Размер готовой сконструированной библиотеки (библиотеки T4VH/Vk) составил примерно $2,8 \times 10^8$.

[00102] Используя в качестве мишени hTIGIT, захваченный на магнитных гранулах M-280 Dynabeads®, конъюгированных со стрептавидином (Life Technologies), библиотеку T4VH/Vk подвергали двум раундам скрининга. 196 клонов подвергали скринингу на связывание с hTIGIT с использованием ИФА. Большинство клонов были положительными и были отобраны для секвенирования. Девять клонов, 1-44, 1-48, 1-60, 1-66, 1-93, 3-5, 3-12, 3-17 и 3-96, с различными последовательностями цепи Vk идентифицировали с помощью ИФА фагов. Эти антитела преобразовывали в полноразмерный IgG1 человека и тестировали на связывание с hTIGIT или mTIGIT с использованием Biacore. Из девяти клонов клон 1-48 показал самую сильную активность связывания как с hTIGIT, так и с mTIGIT, чем другие антитела, как показано на Фиг. 5. Последовательности VH этих клонов идентичны, представляют собой SEQ ID NO: 8 и кодируются нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 14. Последовательности Vk этих клонов показаны на Фиг. 6, где CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) представляют собой аминокислоты 24–34, аминокислоты 50–56 и аминокислоты 89–97, соответственно, в аминокислотной последовательности соответствующей Vk в соответствии с системой Kabat.

[00103] Таблица 1. Информация о последовательности T4M

Антите ло	Нуклеотидная последовательность VH SEQ ID NO.	Аминокислотная последовательность VH SEQ ID NO.	Нуклеотидная последовательность Vk SEQ ID NO.	Аминокислотная последовательность Vk SEQ ID NO.
T4M	14	8	13	12

[00104] Дальнейший анализ последовательности показал, что S50 и Y52 в CDR2 Vk антитела 1-48 вносили вклад в улучшение аффинности антитела 1-48 (Фиг. 6).

[00105] На основании этого результата создавали антитело, T4M, для включения этих двух аминокислот (S50 и Y52) в последовательность зародышевой линии Vk T4. Анализ кинетики связывания подтвердил, что вариант T4M имел улучшенную аффинность связывания по сравнению с исходным антителом T4, в частности, с hTIGIT (Фиг. 7).

Пример 3. Улучшение аффинности связывания hm7 путем перестановки цепи VL

[00106] Для дальнейшего улучшения аффинности связывания hm7 авторы настоящего изобретения создали библиотеку фагового дисплея с переставленной цепью VL, в которой VH hm7 фиксировали и спаривали с библиотекой различных цепей VI (вариабельная легкая лямбда-цепь). Размер готовой сконструированной библиотеки (библиотеки hm7VH/VI) составил примерно 1×10^8 .

[00107] Используя в качестве мишени hTIGIT, захваченный на магнитных гранулах M-280 Dynabeads[®], конъюгированных со стрептавидином (Life Technologies), библиотеку hm7VH/VI подвергали двум раундам скрининга. 576 клонов подвергали скринингу на связывание с hTIGIT с помощью ИФА. Большинство клонов были положительными и были отобраны для секвенирования. 47 антител преобразовывали в полноразмерный hIgG1 и тестировали на связывание с hTIGIT или mTIGIT с использованием SPR. 18 клонов, Tm1, Tm3, Tm4, Tm5, Tm6, Tm7, Tm8, Tm9, Tm10, Tm11, Tm12, Tm13, Tm14, Tm15, Tm17, Tm18, Tm19 и CS19, с различными последовательностями цепей VI показали более высокую аффинность, чем исходное антитело hm7, в отношении связывания с hTIGIT (Фиг. 8). Из них CS19 показало самую сильную активность связывания как с hTIGIT, так и с mTIGIT, чем другие антитела.

[00108] CS19 далее конструировали для минимизации потенциальных нежелательных посттрансляционных модификаций и иммуногенности. Создавали две новые VI, полученные из антитела CS19, и назвали CS19ME-VI (CS19-VI-Q108K/M49L/N97E) и CS19ME-N-VI (CS19-VI-Q108K/M49L/N97E/K55N), соответственно (Фиг. 9).

[00109] Для VH антитела hm7 конструировали две новые VH на основе анализа зародышевой линии и назвали hm7-3-23-VH (hm7-VH-V11L/R16G) и hm7-3-30-VH (hm7-VH-E1Q/L5V), соответственно (Фиг. 10).

[00110] Комбинирование упомянутых выше VH и VL позволило создать два новых антитела, антитела CS19ME3-23 (тяжелая цепь: hm7-3-23-VH; легкая цепь: CS19ME-VI) и CS19ME3-30-N (тяжелая цепь: hm7-3-30-VH; легкая цепь: CS19ME-N-VI). Оба они показали повышенную аффинность связывания по сравнению с их исходным антителом hm7 (Фиг. 11).

[00111] Последовательности VH и VL hm7 и клонов, полученных из hm7, перечислены на Фиг. 10 и Фиг. 9, соответственно. Как показано на Фиг. 9, CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) представляют собой аминокислоты 23–34, аминокислоты 52–58 и аминокислоты 91–102, соответственно, в аминокислотной последовательности соответствующей VL в соответствии с системой Kabat. Как показано на Фиг. 10, CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) представляют собой

аминокислоты 31–35, аминокислоты 50–66 и аминокислоты 99–113, соответственно, в аминокислотной последовательности соответствующей VL в соответствии с системой Kabat.

[00112] Таблица 2. Информация о последовательности CS19ME3-23 и CS19ME3-30-N

Антигено	Нуклеотидная последовательность VH SEQ ID NO.	Аминокислотная последовательность VH SEQ ID NO.	Нуклеотидная последовательность VL SEQ ID NO.	Аминокислотная последовательность VL SEQ ID NO.
CS19ME3-23	29	27	28	26
CS19ME3-30-N	36	34	35	33

Пример 4. Картирование эпитопов антител к TIGIT

[00113] Для картирования эпитопов конструировали химеры домена IgV TIGIT человека и N-концевого домена IgV D1 из hCD155 путем замены остатков во внеклеточных областях hTIGIT соответствующими остатками из hCD155 D1. Создавали три варианта hTIGIT и три химеры, как показано на Фиг. 12А-С. Эти химеры и варианты экспрессировали путем временной трансфекции клеток CHO или 293Т, их уровни экспрессии на клеточной поверхности оценивали с использованием МАТ GC33, распознающего N-концевую метку, слитую с каждой из химер и вариантов или hCD155-hFc (4). Связывание тестируемых антител в формате IgG1 человека (hIgG1) или hCD155-hFc с этими трансфектантами детектировали с использованием FITC-меченого козьего антитела к IgG человека (Thermo Fisher Scientific). Затем клетки анализировали с помощью аппарата для FACS (BD Accuri™ C6).

[00114] С помощью трансфекции клеток CHO этими химерами hTIGIT/hCD155 или вариантами hTIGIT и последующего анализа связывания антител T4, CS19ME3-23 и CS19ME3-30-N с этими трансфектантными клетками CHO с помощью FACS установили, что петля FG во внеклеточном домене IgV hTIGIT является критической для связывания этих антител (Фиг. 12В). Было обнаружено, что петля FG также важна для связывания с лигандом hCD155, что согласуется с предыдущими результатами (5). Таким образом, связываясь с петлей FG, эти три антитела блокируют связывание TIGIT с его лигандом CD155. Благодаря высокой гомологии аминокислотных последовательностей в этой петле

между hTIGIT и mTIGIT эти три антитела способны перекрестно реагировать с ними обоими. Иными словами, антитела T4, CS19ME3-23 и CS19ME3-30-N обладают межвидовой реактивностью в отношении TIGIT человека и мыши.

[00115] Кроме того, на основании результата картирования эпитопов петля С-С' также вовлечена в связывание CS19ME3-23 и CS19ME3-30-N с TIGIT.

[00116] В US2018/0186875A1 (Genentech) показано, что аминокислотные остатки S78, S80 и K82 TIGIT человека являются ключевыми эпитопными остатками для их антител к TIGIT. Для изучения роли этих остатков в связывании антител к TIGIT согласно настоящему изобретению с hTIGIT создавали три варианта hTIGIT, каждый из которых имеет одноточечную мутацию, выбранную из S78A, S80A и K82A. С помощью трансфекции клеток 293Т этими вариантами hTIGIT и последующего анализа связывания антител CS19ME3-30-N с этими трансфектантными клетками 293Т с помощью FACS было установлено, что ни один из трех остатков во внеклеточном домене IgV hTIGIT не является критическим для связывания этих антител (Фиг. 12С).

Пример 5. Антитела к TIGIT оказывают эффективное блокирующее действие на лиганд в ИФА

[00117] Конкурентные анализы на основе ИФА выполняли аналогично анализам связывания на основе ИФА, за исключением того, что тестируемые антитела инкубировали с захваченными антигенами в присутствии конкурентных лигандов. В общих чертах, различные антитела IgG1 человека в серийно разведенных концентрациях смешивали с 0,05 мкг/мл внеклеточного домена hCD155, слитого с Fc-меткой мыши (hCD155-mFc), 0,8 мкг/мл внеклеточного домена mCD155, слитого с Fc-меткой мыши (mCD155-mFc), или 5 мкг/мл внеклеточного домена hCD112, слитого с Fc-меткой мыши (hCD112-mFc), и добавляли к планшетам для ИФА, чтобы конкурировать за связывание между TIGIT и CD155. Сигнал измеряли путем детектирования лиганда с использованием ПХ-конъюгированного вторичного антитела к IgG мыши (Thermo Fisher Scientific).

[00118] CD155 (также известный как PVR или Necl-5) и CD112 (также известный как Pvr12 или нектин-2) являются двумя основными лигандами, которые экспрессируются с высокими уровнями на многих раковых клетках (6). Они оба взаимодействуют с TIGIT для ингибирования функций Т/НК-клеток (6). Была подтверждена конкурентная активность антитела к hTIGIT в отношении связывания TIGIT. Результаты показали, что антитело к hTIGIT показало конкурентную активность в отношении TIGIT с его лигандами CD155 или CD112 в анализе ИФА (Фиг. 13А-С).

Пример 6. Антитела к TIGIT оказывают эффективное блокирующее действие на лиганд в клеточных анализах

[00119] В этом примере описан анализ цитотоксичности НК-клеток, проведенный авторами настоящего изобретения, чтобы показать функцию блокирования лиганда антител к TIGIT согласно настоящей заявке.

1) Создание стабильных клеточных линий

[00120] Предыдущие исследования показали, что клетки YTS (линия НК-клеток) осуществляют ограниченное уничтожения клеток-мишеней 721.221 (линия В-клеток человека, отрицательная по ГКГС класса I) (6-8), и показали, что это уничтожение можно эффективно ингибировать путем экспрессии hTIGIT в клетках YTS и экспрессии hCD155 в клетках 721.221 (6, 7).

[00121] Авторы настоящего изобретения создали клетки YTS, стабильно экспрессирующие hTIGIT (YTS-hTIGIT), и клетки 721.221, стабильно экспрессирующие hCD155 (721.221-hCD155) (Фиг. 14А-В). Для создания стабильных клеточных линий полноразмерную кДНК hTIGIT или hCD155 амплифицировали с помощью ПЦР и клонировали в плазмиду для экспрессии в клетках млекопитающих. Клетки YTS или клетки 721.221 трансфицировали соответствующими плазмидами с использованием системы трансфекции Neon (Thermo Fisher Scientific) или системы трансфекции Nucleofector (Lonza, набор Nucleofector V) в соответствии с инструкцией производителя, соответственно. Через 48 часов после трансфекции трансфицированные клетки иммуноокрашивали hCD155-hFc или hTIGIT-hFc, соответственно, и сортировали положительные клетки. Положительные клетки, идентифицированные с помощью сортировки, культивировали в условиях селекции с G418.

2) Анализ цитотоксичности клеток

[00122] Клетки 721.221-hCD155 (5000 клеток/лунку) инкубировали с YTS-hTIGIT при различных Э:М (эффектор:мишень) в присутствии 5 мкг/лунку антител в течение 6 часов. Затем детектировали высвобождение лактатдегидрогеназы (ЛДГ) клетками, следуя инструкциям набора для нерадиоактивного анализа цитотоксичности CytoTox 96[®] (Promega). Проценты цитотоксичности рассчитывали, следуя инструкции производителя.

[00123] В результате было подтверждено, что взаимодействие hTIGIT, экспрессируемого на YTS, и hCD155, экспрессируемого на 721.221, эффективно ингибировало уничтожение их родительских клеток (уничтожение клетками YTS клеток 721.221) (Фиг. 14С - левая панель).

3) Функциональный анализ блокирования лиганда

[00124] Чтобы протестировать эффект антител к TIGIT согласно настоящей заявке, упомянутый выше анализ цитотоксичности NK-клеток выполняли в присутствии антител T4, CS19ME3-23 и CS19ME3-30-N. Было обнаружено, что антитела T4, CS19ME3-23 и CS19ME3-30-N восстанавливали способность клеток YTS-hTIGIT уничтожать клетки 721.221-hCD155 (Фиг. 14С - посередине и справа), это демонстрирует, что эти антитела эффективно блокируют ингибиторные функции, опосредуемые взаимодействием TIGIT-CD155.

Пример 7. Антитела к TIGIT согласно настоящей заявке индуцировали Fc-опосредуемые эффекторные функции *in vitro*

Конструирование химерных антител в контексте различных Fc

[00125] Различные химерные антитела конструировали в контексте различных изоформ IgG человека и мыши (hIgG1, mIgG1 и mIgG2a) и трех вариантов Fc изоформ hIgG1 и mIgG2a: варианта Fc-D265A/N297A (DANA) или D265A/N297G (DANG) с устраненными Fc γ R-опосредуемыми эффекторными функциями (9-13); варианта Fc-S239D/I332E (DE), варианта Fc-S239D/A330L/I332E (DLE) и афукозилированного hIgG1 (экспрессируемого нокаутными по FUT8 клетками 293F или клетками CHO) с усиленными Fc γ R-опосредуемыми эффекторными функциями (14-22).

Анализ АЗКЦ с использованием линий NK-клеток

[00126] Для анализов АЗКЦ устанавливали клеточную линию Raji, стабильно экспрессирующую полноразмерный hTIGIT (Raji-hTIGIT), и использовали в качестве клеток-мишеней в этом анализе. Создавали клеточную линию Jurkat, стабильно экспрессирующую Fc γ R (рецептор hFc γ RIIIa (F158) или mFc γ RIV) и репортерную люцифразу светлячка, управляемую элементом ответа на ядерный фактор активированных Т-клеток (NFAT) (названную Jurkat-NFAT-Luc2p/hFc γ RIIIa (F158) или Jurkat-NFAT-Luc2p/mFc γ RIV), и использовали в качестве эффекторных клеток.

[00127] Клетки-мишени (15000 клеток/лунку) высевали в лунки 96-луночных планшетов для культивирования клеток с U-образным дном и кратковременно инкубировали с различными концентрациями различных антител. Затем эффекторные клетки добавляли (90000 клеток/лунку) в лунки, содержащие клетки-мишени и антитела в различных

концентрациях в среде RPMI 1640 с добавлением 1% инактивированной нагреванием фетальной бычьей сыворотки, и инкубировали в течение 5 часов при 37°C. Активность АЗКЦ определяли по экспрессии люциферазы в соответствии с инструкциями для реагентов для анализа люциферазы Bright-Glo™ (Promega).

Анализ АЗКФ с использованием макрофагов мыши

[00128] Для анализов АЗКФ в качестве эффекторных клеток в этом анализе использовали макрофаги, полученные из костного мозга мыши (BMDM). Для получения BMDM клетки костного мозга мышей собирали из голени и бедренной кости мышей C57 и индуцировали гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором (GM-CSF) в супернатантах L929 в течение 3 дней. Стабильную клеточную линию Raji-hTIGIT метили CFSE и использовали в качестве клеток-мишеней. BMDM метили антителом F4/80-Alex Fluor647 против мышинового белка (Thermo Fisher Scientific) перед инкубацией с клетками-мишенями. Меченые CFSE клетки-мишени высевали при плотности 2×10^5 клеток/лунку и инкубировали с различными антителами согласно настоящей заявке (20 мкг/мл) при комнатной температуре в течение 15 минут, а затем добавляли к меченым BMDM (1×10^5 клеток/лунку, что приводило к соотношению Э:М 1:2) при 37°C в течение 2 часов в увлажненном инкубаторе с 5% CO₂ в среде DMEM+10% инактивированной нагреванием ФБС. Фагоцитоз CFSE-меченых клеток-мишеней макрофагами, меченными антителом F4/80 против белка мыши, регистрировали с использованием конфокального микроскопа Nikon A1R.

Анализ комплемент-опосредуемой цитотоксичности (КЗЦ)

[00129] Для анализов КЗЦ стабильные клетки Raji-hTIGIT использовали в качестве клеток-мишеней и высевали в 96-луночный планшет с U-образным дном при 4×10^5 клеток/лунку, инкубировали со 100 нМ антител к TIGIT согласно настоящей заявке в указанных концентрациях в присутствии 5% сыворотки кролика (Sigma). Через 2 часа инкубации супернатанты в каждой лунке анализировали на высвобождение ЛДГ с помощью набора для нерадиоактивного анализа цитотоксичности CytoTox 96® (Promega).

[00130] Чтобы исследовать, как антитела к TIGIT оказывают свое противоопухолевое действие независимо от взаимодействия между TIGIT и CD155 на опухолях, авторы настоящего изобретения сначала исследовали с использованием анализов *in vitro*, обладают ли антитела к TIGIT Fc-опосредуемыми эффекторными функциями, включая АЗКЦ, АЗКФ и КЗЦ.

[00131] Предыдущие исследования показали, что FcγRIV мыши являлся преобладающим рецептором, участвующим в АЗКЦ у мышей, и было предположено, чтобы он является «функциональным» гомологом FcγRIIIa человека (23, 24). Для тестирования АЗКЦ антител авторы настоящего изобретения создавали репортерные системы, в которых в качестве эффекторных клеток использовали Т-лимфоциты Jurkat, экспрессирующие hFcγRIIIa (аллель F158) или mFcγRIV (23, 24) и элемент ответа NFAT, управляющий экспрессией люциферазы светлячка; и в которых в качестве клеток-мишеней использовали клетки Raji, стабильно экспрессирующие hTIGIT (Raji-hTIGIT). Для тестирования АЗКЦ антител IgG мыши авторы настоящего изобретения использовали модифицированную систему (25), в которой в качестве эффекторных клеток использовали Т-лимфоциты Jurkat, экспрессирующие FcγRIV мыши и элемент ответа NFAT, управляющий экспрессией люциферазы светлячка (Jurkat-NFAT-Luc2p/mFcγRIV), и в качестве клеток-мишеней использовали Raji-hTIGIT. При этом для тестирования АЗКЦ антител hIgG авторы настоящего изобретения использовали систему (25), в которой в качестве эффекторных клеток использовали Т-лимфоциты Jurkat человека, экспрессирующие FcγRIIIa (аллель F158) и элемент ответа NFAT, управляющий экспрессией люциферазы светлячка (Jurkat-NFAT-Luc2p/hFcγRIIIa), и в качестве клеток-мишеней использовали Raji-hTIGIT (Фиг. 15А). Этот анализ АЗКЦ показал, что T4, CS19ME3-23 и CS19ME3-30-N, либо в изоформе hIgG1, либо в изоформе mIgG2a, индуцировали цитотоксический эффект, выполняемый эффекторными клетками против клеток-мишеней. Как и ожидалось, hIgG1/mIgG2a-DE, hIgG1/mIgG2a-DLE и hIgG1-афукозилированные варианты проявляли значительно более высокую активность АЗКЦ, чем hIgG1 и mIgG2a дикого типа; в то время как hIgG1/mIgG2a-DANA/DANG и mIgG1 не индуцировали никакой функции АЗКЦ (Фиг. 15В–Е).

[00132] Для тестирования активности АЗКФ антител в качестве эффекторных клеток и клеток-мишеней использовали BMDM и Raji-hTIGIT, соответственно. Антитела T4 и CS19ME3-30-N в контексте изотипа mIgG2a, варианта mIgG2a-DE, варианта mIgG2a-DLE и изотипа hIgG1 проявляли сходные уровни активности АЗКФ, в то время как mIgG1 и mIgG2a-DANA/DANG не индуцировали АЗКФ (Фиг. 16).

[00133] Для тестирования активности КЗЦ антител клеточную линию Raji-hTIGIT использовали в качестве клеток-мишеней, и высвобождение лактатдегидрогеназы (ЛДГ) использовали в качестве показателя лизиса клеток-мишеней посредством комплемента. В случае антител mIgG T4-mIgG2a, T4-mIgG2a-DE и T4-mIgG2a-DANA показали сходную активность КЗЦ, в то время как T4-mIgG1 и T4-mIgG2a-DLE вообще не вызывали КЗЦ (Фиг. 17А). CS19ME3-23-mIgG2a показало более сильную КЗЦ, чем CS19ME3-23-mIgG2a-DANG,

а CS19ME3-23-mIgG2a-DANG показало более сильную КЗЦ, чем CS19ME3-23-mIgG2a-DE, тогда как CS19ME3-23-mIgG1 и CS19ME3-23-mIgG2a-DLE вообще не вызывали КЗЦ (Фиг. 17B). В случае антител CS19ME3-23 и CS19ME3-30-N hIgG только hIgG1 показал эффективную функцию КЗЦ, но не другие варианты (Фиг. 17C). Кроме того, их hIgG1-афукозилированные варианты проявляли активность КЗЦ, сходную с таковой hIgG1 (Фиг. 17D).

[00134] В совокупности эти исследования продемонстрировали, что антитела к TIGIT согласно настоящей заявке обладают Fc-опосредуемыми эффекторными функциями *in vitro*, в дополнение к своей активности по блокированию связывания TIGIT с CD155. Эти антитела с вариантами Fc обеспечивали набор инструментов для последующих исследований *in vivo* с использованием моделей на мышах.

Пример 8. Антитела к TIGIT согласно настоящей заявке имели мощную противоопухолевую активность, зависящую от Fc-опосредуемых эффекторных функций, в моделях на животных

В этом примере противоопухолевые эффекты антител к TIGIT оценивали с использованием сингенных опухолевых моделей на иммунокомпетентных мышах. Эффекторные функции антител к TIGIT также исследовали на предмет их вклада в противоопухолевые эффекты.

Детектирование экспрессии mCD155 на линиях опухолевых клеток мыши с использованием FACS

[00135] Линии опухолевых клеток мыши CT26 (карцинома толстой кишки), A20 (В-клеточная лимфома) и 4T1 (рак молочной железы) исследовали на экспрессию CD155 мыши (mCD155). Для исследования экспрессии mCD155 на поверхности опухолевых клеток использовали крысиное антитело к mCD155 4.24.1 (Biolegend). Ослиное антитело к крысиному IgG, конъюгированное с Alexa Fluor 488, использовали в качестве вторичного антитела (Thermo Fisher Scientific). Для окрашивания клеток A20 рецепторы Fc клеточной поверхности предварительно блокировали с использованием 2.4G2 (антитело, блокирующее связывание Fc с FcγRII и FcγRIII мыши) до окрашивания mCD155 (Фиг. 18A).

Исследования на животных

[00136] Все эксперименты на животных проводили в соответствии с национальными руководствами по содержанию и уходу за лабораторными животными в Китае и выполняли в соответствии с утвержденными протоколами IACUC в Национальном институте

биологических наук, Пекин.

[00137] Для создания моделей опухолей на мышах самкам мышей BALB/c в возрасте 6–8 недель подкожно инокулировали $1-3 \times 10^5$ клеток CT26, A20 или 4T1 в правый бок. На основании сходных средних объемов опухолей ($50-100 \text{ мм}^3$, если конкретно не указано иное) мышей рандомизировали в группы ($n=3-6/\text{группу}$) и вводили путем внутрибрюшной инъекции антитело к TIGIT (10 мг/кг), его варианты или буфер ФСБ два раза в неделю, в общей сложности 5 или 6 инъекций. Объем опухоли измеряли электронным штангенциркулем и рассчитывали с помощью модифицированной формулы эллипсоида как $1/2 \times (\text{длина} \times \text{ширина}^2)$.

[00138] Для обеих опухолевых моделей CT26 и A20 лечение CS19ME3-30-N-mIgG2a, T4-hIgG1, T4-mIgG2a или CS19ME3-23-mIgG2a значительно ингибировало рост опухоли и даже индуцировало регрессию опухоли по сравнению с контрольной группой (Фиг. 18B–E).

[00139] Чтобы протестировать, вносят ли эффекторные функции этих антител к TIGIT вклад в их противоопухолевое действие *in vivo*, авторы настоящего изобретения сравнили противоопухолевую активность набора вариантов Fc антител с усиленными или устраненными эффекторными функциями. У мышей BALB/c, несущих опухолевые модели CT26 или A20, лечение вариантами mIgG2a-DLE или mIgG2a-DE антител к TIGIT (T4 или CS19ME3-23) привело к улучшенным противоопухолевым эффектам по сравнению с mIgG2a дикого типа с особенно выраженными улучшениями против опухолей A20 (Фиг. 18E–F), которые, как было установлено, соответствовали их усиленным эффекторным функциям АЗКЦ, как было определено ранее в Примере 7 и на Фиг. 15. Варианты mIgG2a-DANA, лишенные функций АЗКЦ и АЗКФ *in vitro*, проявляли минимальную противоопухолевую активность или вообще не проявляли ее против обеих опухолей CT26 и A20 (Фиг. 18E–F). Ссылаясь на вывод о том, что mIgG2a-DLE не имело функции КЗЦ *in vitro* (как описано в Примере 7 выше), можно предположить, что наблюдаемые противоопухолевые эффекты этих вариантов не требуют функции КЗЦ.

Фармакокинетический анализ

[00140] Авторы настоящего изобретения исследовали ФК профиль вариантов Fc антитела T4 у мышей BALB/c. В этом эксперименте использовали самок мышей BALB/c в возрасте 6–8 недель. Кровь собирали в различные моменты времени после однократной внутрибрюшинной инъекции тестируемых антител. Концентрации антител в сыворотке измеряли с помощью mTIGIT-связывающего ИФА.

[00141] В отношении ФК профиля вариантов Fc антитела T4 было обнаружено, что T4-

mIgG2a, T4-mIgG2a-DANA, а также T4-hIgG1, все имели сопоставимые ФК профили, тогда как T4-mIgG2a-DE и T4-mIgG2a-DLE имели заметно более быстрый клиренс и более короткие периоды полужизни в сыворотке (Фиг. 19), предположительно из-за более низкой стабильности этих антител *in vivo*. Несмотря на эти очевидно худшие ФК профили и ссылаясь на то, что T4-mIgG2a-DE и T4-mIgG2a-DLE показали более сильную противоопухолевую активность (Фиг. 18E-F), можно сделать вывод, что улучшенная противоопухолевая активность этих двух вариантов антитела (T4-mIgG2a-DE и T4-mIgG2a-DLE) может быть отнесена к их лучшим эффекторным функциям.

[00142] В совокупности результаты, приведенные выше, продемонстрировали, что эффекторные функции, опосредуемые взаимодействием с FcγR, важны для противоопухолевой активности антител к TIGIT *in vivo*, поскольку варианты Fc с усиленными эффекторными функциями имели улучшенную противоопухолевую эффективность *in vivo*. Таким образом, в одном варианте реализации настоящей заявки антитела к TIGIT представляют собой варианты Fc с усиленными эффекторными функциями.

Пример 9. Вовлечение CD8+ Т- и NK-клеток в регрессию опухоли, опосредуемую антителами к TIGIT

[00143] В этом примере авторы настоящего изобретения стремились идентифицировать типы иммунных клеток, которые способствуют противоопухолевому эффекту антител к TIGIT согласно настоящей заявке, путем проведения исследований истощения иммунных клеток *in vivo*.

Истощение иммунных клеток *in vivo*

[00144] Для истощения CD4 или CD8+ Т-клеток мышам BALB/c, несущим опухоль, вводили путем инъекции 200 мкг CD4-истощающих антител (клон GK1.5, BioXCell) или CD8-истощающих антител (клон 2.43, BioXCell) за два дня до лечения антителом T4 и два раза в неделю.

[00145] Для истощения NK-клеток мышам вводили путем инъекции 50 мкг поликлонального антитела к асиало-GM1 (Poly21460, Biolegend) за один день до лечения антителом T4 и один раз каждые пять дней.

[00146] Для истощения нейтрофилов мышам вводили путем инъекции 400 мкг моноклонального антитела к Ly6G (клон 1A8, BioXCell) за два дня до лечения антителом T4 и два раза в неделю.

[00147] Для истощения макрофагов мышам вводили путем инъекции 100 мкл липосом с клодронатом (FormuMax) за один день до лечения антителом T4, а затем один раз в неделю.

[00148] Истошающие антитела или реагенты вводили до конца лечения антителом T4 для всех экспериментов по истощению иммунных клеток. Эффективность способов истощения иммунных клеток, описанных выше, подтверждали с использованием мышей BALB/c, которые не подвергались воздействию опухоли.

Вовлечение CD4+ или CD8+ T-клеток

[00149] Сначала вклад T-клеток оценивали с использованием упомянутой выше модели опухоли CT26. Было обнаружено, что лечение антителом T4 индуцировало эффективную регрессию опухоли CT26 у мышей BALB/c WT, но гораздо меньшую противоопухолевую активность у бестимусных мышей с дефицитом T-клеток (Фиг. 20А), это явно указывает на то, что T-клетки необходимы для полного терапевтического эффекта антитела T4.

[00150] Чтобы установить, какая подгруппа(ы) T-клеток участвует в регрессии опухоли, опосредуемой антителом T4, CD4+ или CD8+ T-клетки истощали путем обработки мышей антителом к CD4 или антителом к CD8, соответственно, у мышей BALB/c, несущих установленные опухоли CT26, за два дня до лечения антителом T4. Истощение CD4+ клеток само по себе значительно подавляло рост опухоли независимо от статуса лечения антителом T4, это свидетельствует о том, что обработка антителом к CD4 привела к удалению иммуносупрессорных CD4+ клеток и что CD4+ клетки, по-видимому, не требуются для противоопухолевой активности антитела T4 (Фиг. 20В).

[00151] Напротив, опухоли росли быстрее у мышей, у которых CD8+ T-клетки были истощены, по сравнению с мышами без истощения клеток, независимо от статуса лечения антителом T4, это указывает на то, что CD8+ T-клетки функционируют как важные эффекторы в естественном иммунитете против опухоли CT26. Кроме того, истощение CD8+ T-клеток полностью устраняло терапевтический эффект антитела T4 (Фиг. 20С), это подтверждает, что CD8+ T-клетки являются существенными для наблюдаемых противоопухолевых эффектов антитела T4.

Вовлечение NK-клеток

[00152] Затем потенциальные роли NK-клеток в противоопухолевой активности антитела T4 оценивали посредством истощения NK-клеток с использованием антитела к асиало-GM1. Истощение NK-клеток начинали за день до лечения антителом T4 у мышей, несущих установленные опухоли CT26, и продолжали до конца лечения антителом T4.

[00153] Подобно нашим наблюдениям с CD8⁺ клетками было обнаружено, что NK-клетки функционируют в данном случае как важные природные противоопухолевые эффекторные клетки. В частности, опухоли росли гораздо быстрее у мышей с истощенными NK, чем у мышей, без истощения NK. Кроме того, истощение NK-клеток значительно ухудшало терапевтический эффект лечения антителом T4 (Фиг. 20D), это указывает на то, что NK-клетки вовлечены в противоопухолевые эффекты антитела T4.

Вовлечение нейтрофилов и макрофагов

[00154] Также оценивали роль нейтрофилов и макрофагов в терапевтическом эффекте антитела T4 путем истощения этих типов клеток с использованием антитела к Ly6G (клон 1A8) для истощения нейтрофилов и с использованием липосом с клодронатом для истощения макрофагов.

[00155] Было обнаружено, что истощение нейтрофилов или макрофагов не оказывало существенного влияния на противоопухолевую активность антитела T4, это указывает на то, что они вряд ли участвовали в противоопухолевых эффектах антитела T4 (Фиг. 20E-F).

Исследования истощения в модели сингенной опухоли A20 на мышах

[00156] Сходные исследования истощения иммунных клеток проводили на сингенных мышах BALB/c, несущих опухоли A20. Наблюдали результаты, сходные с таковыми для модели опухоли CT26. В частности, истощение CD8⁺ T- или NK-клеток блокировало или существенно снижало противоопухолевые эффекты антитела T4, соответственно, в то время как истощение CD4⁺ T, нейтрофилов или макрофагов оказывало незначительное влияние или не оказывало никакого влияния на исходы опухоли после лечения антителом T4 (Фиг. 20G-K).

[00157] В совокупности наши результаты демонстрируют, что CD8⁺ T и NK иммунные клетки вносят вклад в терапевтический эффект антитела T4 в обеих моделях опухолей CT26 и A20 на мышах.

Пример 10. Перекрестная защитная иммунная память и долговременная противоопухолевая иммунная память, индуцированная лечением антителами к TIGIT

[00158] В этом примере описана долговременная противоопухолевая иммунная память и перекрестный защитный эффект после лечения антителами к TIGIT согласно настоящему изобретению, обнаруженными авторами настоящего изобретения.

Исследования повторной опухолевой иммунизации

[00159] Мышей с полной регрессией опухолей CT26 или A20 после лечения антителами к TIGIT повторно иммунизировали опухолями CT26, A20 или 4T1 на 80–100 день после первоначальной инокуляции опухоли путем подкожной (п/к) инокуляции опухолевых клеток ($1-3 \times 10^5$ CT26, A20 или 4T1) в левый бок. Подобранные по возрасту наивные мыши были использованы в качестве контролей и получали такие же опухолевые имплантаты, что и группы повторной иммунизации. Рост опухоли отслеживали с течением времени путем измерения объемов опухолей дважды в неделю. Сыворотки мышей собирали перед повторной иммунизацией опухолевыми клетками, и было подтверждено, что у них нет детектируемых антител к TIGIT перед повторной иммунизацией.

Эффект иммунной памяти

[00160] В отличие от подобранных по возрасту наивных мышей мыши, излеченные антителами к TIGIT, были устойчивы к повторной иммунизации той же опухолью. Например, мыши, излеченные от CT26, были устойчивы к повторной иммунизации CT26, и то же самое справедливо для опухоли A20 (Фиг. 21А и В).

[00161] Кроме того, было обнаружено, что у мышей с полной регрессией опухолей CT26 или A20 развился перекрестный противоопухолевый иммунитет, отторгающий оба типа опухолей, но не к другой отличающейся опухоли 4T1 (Фиг. 21А и В).

[00162] Эти результаты демонстрируют, что лечение антителами к TIGIT может приводить к защитной и долговременной противоопухолевой иммунной памяти, и эта память способна перекрестно защищать от опухоли другого типа, которая реагирует на лечение антителами к TIGIT, но не от той, которая устойчива к лечению антителами к TIGIT.

Пример 11. Антитело к TIGIT показывает мощные противоопухолевые эффекты даже в низкой дозе

[00163] В этом примере описаны исследования на животных, в которых изучается противоопухолевый эффект антител к TIGIT в различных дозах.

[00164] Все эксперименты на животных проводили в соответствии с национальными руководствами по содержанию и уходу за лабораторными животными в Китае и выполняли в соответствии с утвержденными протоколами IACUC в Национальном институте биологических наук, Пекин.

[00165] Для моделей опухолей на мышах самкам мышей BALB/c в возрасте 6-8 недель

подкожно инокулировали 2×10^5 клеток СТ26 в правый бок. На основании сходных средних объемов опухолей СТ26 (20-80 мм³) мышей рандомизировали в пять групп (группа 0,3 мг/кг, группа 1 мг/кг, группа 3 мг/кг, группа 10 мг/кг и группа без лечения в качестве контроля; n=5-6/группу) и вводили путем внутрибрюшинной инъекции антитело к TIGIT (CS19ME3-30-N-hIgG1-afuco) один раз в неделю 4 раза. Объем опухоли измеряли электронным штангенциркулем и рассчитывали с помощью модифицированной формулы эллипсоида $1/2 \times (\text{длина} \times \text{ширина}^2)$.

[00166] Для изучения противоопухолевой активности низких и высоких доз антитела к TIGIT в моделях на мышах, несущих опухоли, противоопухолевую активность антитела в различных дозах сравнивали в моделях на иммунокомпетентных мышах, несущих опухоли. В модели на мышах BALB/c, несущих опухоль СТ26, лечение антителом к TIGIT (CS19ME3-30-N-hIgG1-afuco) показало мощную противоопухолевую активность даже при самой низкой дозе 0,3 мг/кг (**Фиг. 22**). Не наблюдали очевидной зависимости от дозы антитела.

Пример 12. Применение антитела к TIGIT в комбинации с антителом к PD-1 или антителом к PD-L1

[00167] В этом примере изучали комбинированное применение антител к TIGIT согласно настоящей заявке с антителом к mPD-1 или mPD-L1 в двух различных моделях на мышах, несущих опухоли. Антитело к mPD-1 (RMP1-14) получили из BioXCell, а антитело к mPD-L1 отобрали из библиотеки фагового дисплея антител с использованием внеклеточного домена (ВКД) PD-L1 мыши (mPD-L1-ВКД; Uniprot ID Q9EP73) в качестве мишени. Это антитело экспрессировали в виде антитела mPD-L1-mIgG2a (mP4) и использовали в этом анализе.

[00168] Все эксперименты на животных проводили в соответствии с национальными руководствами по содержанию и уходу за лабораторными животными в Китае и выполняли в соответствии с утвержденными протоколами IACUC в Национальном институте биологических наук, Пекин.

[00169] Для моделей опухолей на мышах самкам мышей C57BL/6N или BALB/c в возрасте 6-8 недель подкожно инокулировали 1×10^5 клеток MC38 или 2×10^5 клеток СТ26 в правый бок.

[00170] Мышей, несущих опухоли MC38, рандомизировали в группы (группа лечения антителом к TIGIT (CS19ME3-30-N-mIgG2a, 10 мг/кг), группа лечения антителом к mPD-1 (RMP1-14, 3 мг/кг), группа комбинированного лечения и группа без лечения (ФСБ) в

качестве контроля; n=3-6/группу) и вводили путем внутрибрюшинной инъекции антитело к TIGIT и/или антитело к mPD-1 (BioXCell, RMP1-14) или ФСБ.

[00171] На основании сходных средних объемов опухолей CT26 (120-270 мм³) мышей рандомизировали в группы (n=3-6/группу) и вводили путем внутрибрюшной инъекции антитело к TIGIT и/или антитело к mPD-1 (BioXCell, RMP1-14) или антитело к TIGIT и/или собственное антитело к mPD-L1 (mP4) два раза в неделю 4-6 раз.

[00172] Объем опухоли измеряли электронным штангенциркулем и рассчитывали с помощью модифицированной формулы эллипсоида $1/2 \times (\text{длина} \times \text{ширина}^2)$.

[00173] Как показано на Фиг. 23, антитела к TIGIT (CS19ME3-30-N-mIgG2a и CS19ME3-30-N hIgG1-afuco) продемонстрировали синергическую противоопухолевую эффективность в комбинации с антителами к mPD-1 или PD-L1 в моделях на мышах, несущих как опухоли MC38, так и CT26. Эти наблюдения позволяют предположить, что антитела к TIGIT согласно настоящему изобретению можно применять в ряде терапевтических приложений, например, для лечения различных видов рака, по отдельности или в комбинации с другим терапевтическим агентом, таким как противоопухолевый агент, например, агент против mPD-1 или агент против mPD-L1.

Цитируемые источники

1. Harrison JL, Williams SC, Winter G, Nissim A. Screening of phage antibody libraries. *Methods Enzymol* 1996;267:83-109.
2. McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 1990;348:552-554.
3. Li D, He W, Liu X, Zheng S, Qi Y, Li H, Mao F, et al. A potent human neutralizing antibody Fc-dependently reduces established HBV infections. *Elife* 2017;6.
4. Kiyotaka Nakano, Takeshi Yoshino, Jun-ichi Nezu, Hiroyuki Tsunoda, Tomoyuki Igawa, Hiroko Konishi, Megumi Tanaka, et al., inventors; Anti-glypican 3 antibody. United States patent US 7919086 B2. 2005.
5. Stengel KF, Harden-Bowles K, Yu X, Rouge L, Yin J, Comps-Agrar L, Wiesmann C, et al. Structure of TIGIT immunoreceptor bound to poliovirus receptor reveals a cell-cell adhesion and signaling mechanism that requires cis-trans receptor clustering. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:5399-5404.
6. Liu S, Zhang H, Li M, Hu D, Li C, Ge B, Jin B, et al. Recruitment of Grb2 and SHIP1 by the ITT-like motif of TIGIT suppresses granule polarization and cytotoxicity of NK cells. *Cell Death Differ* 2013;20:456-464.

7. Stanietsky N, Simic H, Arapovic J, Toporik A, Levy O, Novik A, Levine Z, et al. The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:17858-17863.
8. Chen X, Allan DS, Krzewski K, Ge B, Kopcow H, Strominger JL. CD28-stimulated ERK2 phosphorylation is required for polarization of the microtubule organizing center and granules in YTS NK cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:10346-10351.
9. Shields RL, Namenuk AK, Hong K, Meng YG, Rae J, Briggs J, Xie D, et al. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J Biol Chem* 2001;276:6591-6604.
10. Wilson NS, Yang B, Yang A, Loeser S, Marsters S, Lawrence D, Li Y, et al. An Fc gamma receptor-dependent mechanism drives antibody-mediated target-receptor signaling in cancer cells. *Cancer Cell* 2011;19:101-113.
11. Ferrari de Andrade L, Tay RE, Pan D, Luoma AM, Ito Y, Badrinath S, Tsoucas D, et al. Antibody-mediated inhibition of MICA and MICB shedding promotes NK cell-driven tumor immunity. *Science* 2018;359:1537-1542.
12. Seshasayee D, Lee WP, Zhou M, Shu J, Suto E, Zhang J, Diehl L, et al. In vivo blockade of OX40 ligand inhibits thymic stromal lymphopoietin driven atopic inflammation. *J Clin Invest* 2007;117:3868-3878.
13. Lo M, Kim HS, Tong RK, Bainbridge TW, Vernes JM, Zhang Y, Lin YL, et al. Effector-attenuating Substitutions That Maintain Antibody Stability and Reduce Toxicity in Mice. *J Biol Chem* 2017;292:3900-3908.
14. Lazar GA, Dang W, Karki S, Vafa O, Peng JS, Hyun L, Chan C, et al. Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:4005-4010.
15. Horton HM, Bennett MJ, Peipp M, Pong E, Karki S, Chu SY, Richards JO, et al. Fc-engineered anti-CD40 antibody enhances multiple effector functions and exhibits potent in vitro and in vivo antitumor activity against hematologic malignancies. *Blood* 2010;116:3004-3012.
16. Horton HM, Bennett MJ, Pong E, Peipp M, Karki S, Chu SY, Richards JO, et al. Potent in vitro and in vivo activity of an Fc-engineered anti-CD19 monoclonal antibody against lymphoma and leukemia. *Cancer Res* 2008;68:8049-8057.
17. Mohseni Nodehi S, Repp R, Kellner C, Brautigam J, Staudinger M, Schub N, Peipp M, et al. Enhanced ADCC activity of affinity matured and Fc-engineered mini-antibodies directed against the AML stem cell antigen CD96. *PLoS One* 2012;7:e42426.
18. Schewe DM, Alsadeq A, Sattler C, Lenk L, Vogiatzi F, Cario G, Vieth S, et al. An Fc-

engineered CD19 antibody eradicates MRD in patient-derived MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemia xenografts. *Blood* 2017;130:1543-1552.

19. Xu H, Guo H, Cheung IY, Cheung NK. Antitumor Efficacy of Anti-GD2 IgG1 Is Enhanced by Fc Glyco-Engineering. *Cancer Immunol Res* 2016;4:631-638.

20. Koerner SP, Andre MC, Leibold JS, Kousis PC, Kubler A, Pal M, Haen SP, et al. An Fc-optimized CD133 antibody for induction of NK cell reactivity against myeloid leukemia. *Leukemia* 2017;31:459-469.

21. Kellner C, Otte A, Cappuzzello E, Klausz K, Peipp M. Modulating Cytotoxic Effector Functions by Fc Engineering to Improve Cancer Therapy. *Transfus Med Hemother* 2017;44:327-336.

22. Shields RL, Lai J, Keck R, O'Connell LY, Hong K, Meng YG, Weikert SH, et al. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human FcγRIII and antibody-dependent cellular toxicity. *J Biol Chem* 2002;277:26733-26740.

23. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcγ receptors: old friends and new family members. *Immunity* 2006;24:19-28.

24. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science* 2005;310:1510-1512.

25. Hsieh YT, Aggarwal P, Cirelli D, Gu L, Surowy T, Mozier NM. Characterization of FcγRIIIA effector cells used in in vitro ADCC bioassay: Comparison of primary NK cells with engineered NK-92 and Jurkat T cells. *J Immunol Methods* 2017;441:56-66.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с TIGIT человека (Т-клеточным иммунорецептором с доменами Ig и ITIM) и TIGIT мыши, содержащее:

(1) переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий HCDR1 (определяющий комплементарность участок тяжелой цепи 1), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; и/или переменный домен легкой цепи (VL), содержащий LCDR1 (определяющий комплементарность участок легкой цепи 1), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11;

(2) переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; и/или переменный домен легкой цепи (VL), содержащий LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, и LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25;

(3) переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; и/или переменный домен легкой цепи (VL), содержащий LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, и LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32;

(4) переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и HCDR3, имеющий аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 6; и/или переменный домен легкой цепи (VL), содержащий LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; или

(5) переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий HCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, HCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и HCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; и/или переменный домен легкой цепи (VL), содержащий LCDR1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, LCDR2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и LCDR3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, содержащий

(1) переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 8; и/или переменный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 12;

(2) переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности SEQ ID NO: 27; и/или переменный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 26; или

(3) переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности SEQ ID NO: 34; и/или переменный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 33.

3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, содержащий

(1) переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; и/или переменный домен легкой цепи (VL),

содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12;

(2) переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27; и/или переменный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; или

(3) переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34; и/или переменный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33.

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что указанное антитело представляет собой антитело IgG1 человека или его вариант, имеющий усиленную эффекторную функцию или не обладающий эффекторными функциями.

5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-3, который дополнительно модифицирован путем изменения области Fc таким образом, чтобы (1) усилить функцию АЗКЦ, (2) усилить функцию АЗКФ; и/или (3) уменьшить или устранить функцию КЗЦ, по сравнению с антителом без такой модификации.

6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что указанное антитело представляет собой афукозилированное антитело.

7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, отличающийся тем, что указанное афукозилированное антитело имеет усиленные эффекторные функции по сравнению с его фукозилированным аналогом.

8. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-7.

9. Нуклеиновая кислота по п. 8, содержащая

(1) нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 14, и/или нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 13;

(2) нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 29, и/или нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99%

или 100% идентичности нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 28; или

(3) нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 36, и/или нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 35.

10. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 8 или п. 9.

11. Клетка, содержащая нуклеиновую кислоту по п. 8 или 9 или вектор по п. 10.

12. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-7 при лечении рака или вирусной инфекции.

13. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-7 в комбинации с дополнительным терапевтическим агентом при лечении рака или вирусной инфекции.

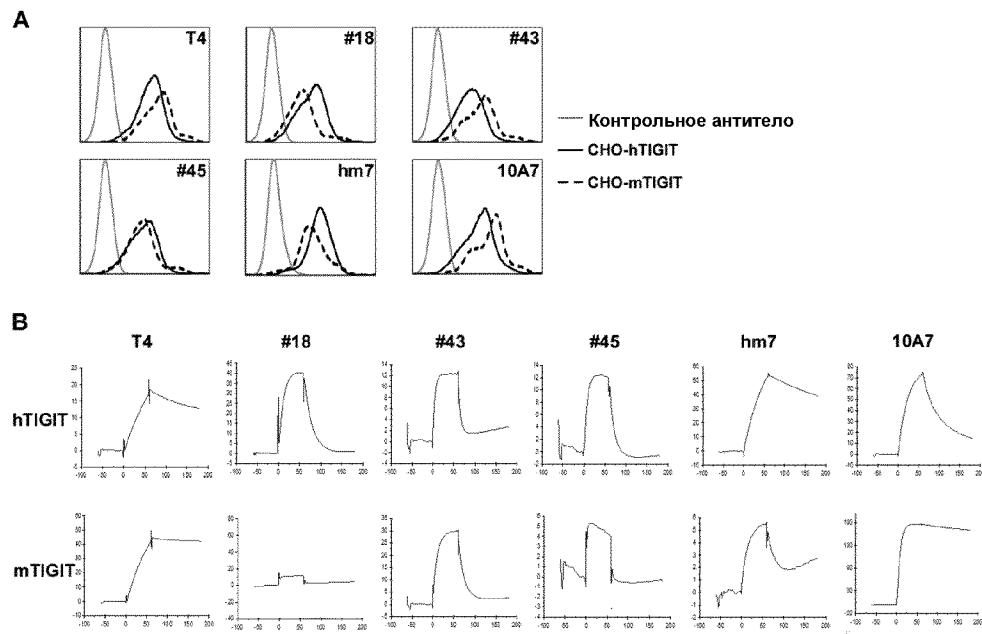
14. Применение по п. 13, отличающееся тем, что указанный дополнительный терапевтический агент выбран из группы: антитела к PD-1, антитела к PD-L1, антитела к LAG-3, антитела к CTLA-4 или антитела к TIM3.

15. Способ лечения рака или вирусной инфекции у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-7.

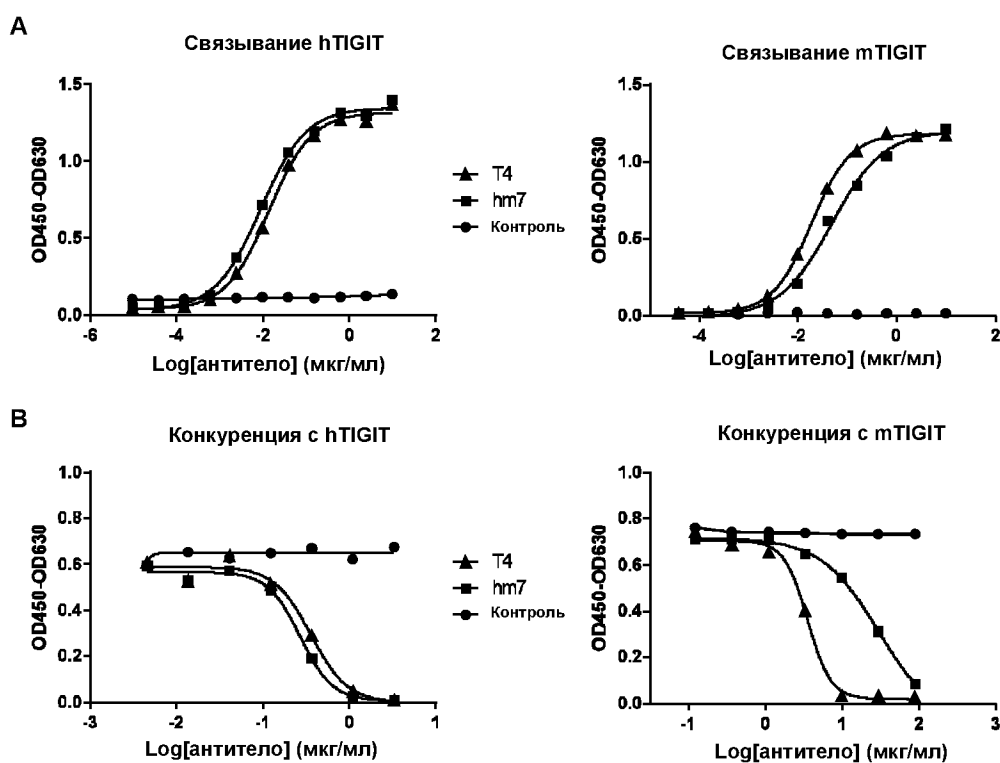
16. Способ по п. 15, отличающийся тем, что указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент блокирует связывание TIGIT с CD155 и проявляет эффекторную функцию.

	10	20	30	40	50	60
hTIGIT-ECD	MTGTIETTGNISAEKGGSIILQCHLSSTTAQVTQVNWEQQDQLLAICNADLGWHISPSFKDRVA					
mTIGIT-ECD	---.D.KR....E...V.....F..D..E....D.K.....YSV.....VASV.S...V					
	70	80	90	100	110	
hTIGIT-ECD	PGPGLGLTLQSLTVNDTGEYFCIYHTYPDGTGTGRIFLEVLESSVAEHGARFQIP					
mTIGIT-ECD	...S....F....M.....T.....G.I.K.....K.Q.....QFQTAPLGG					

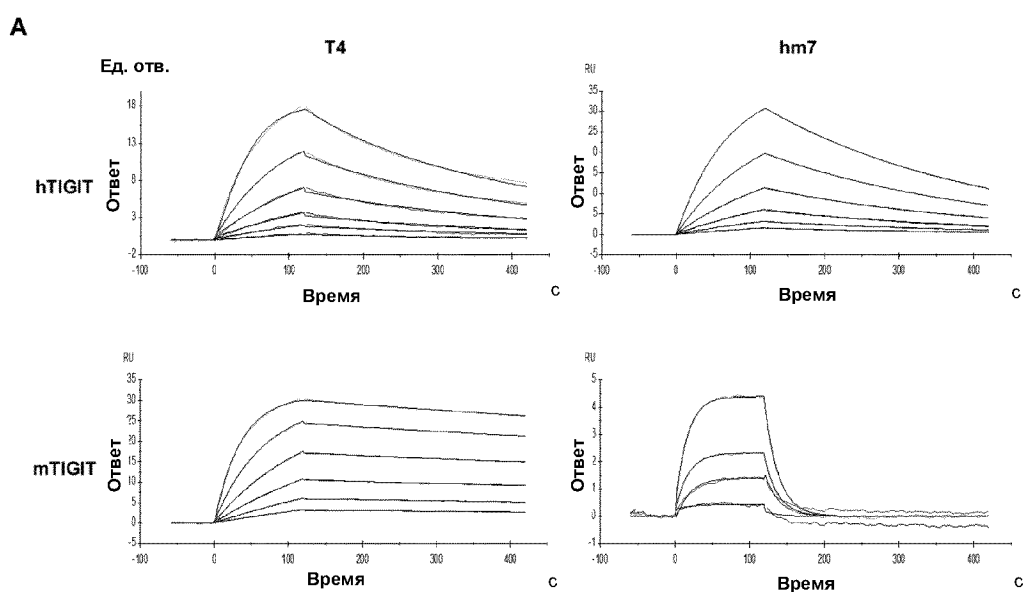
ФИГ. 1



ФИГ. 2

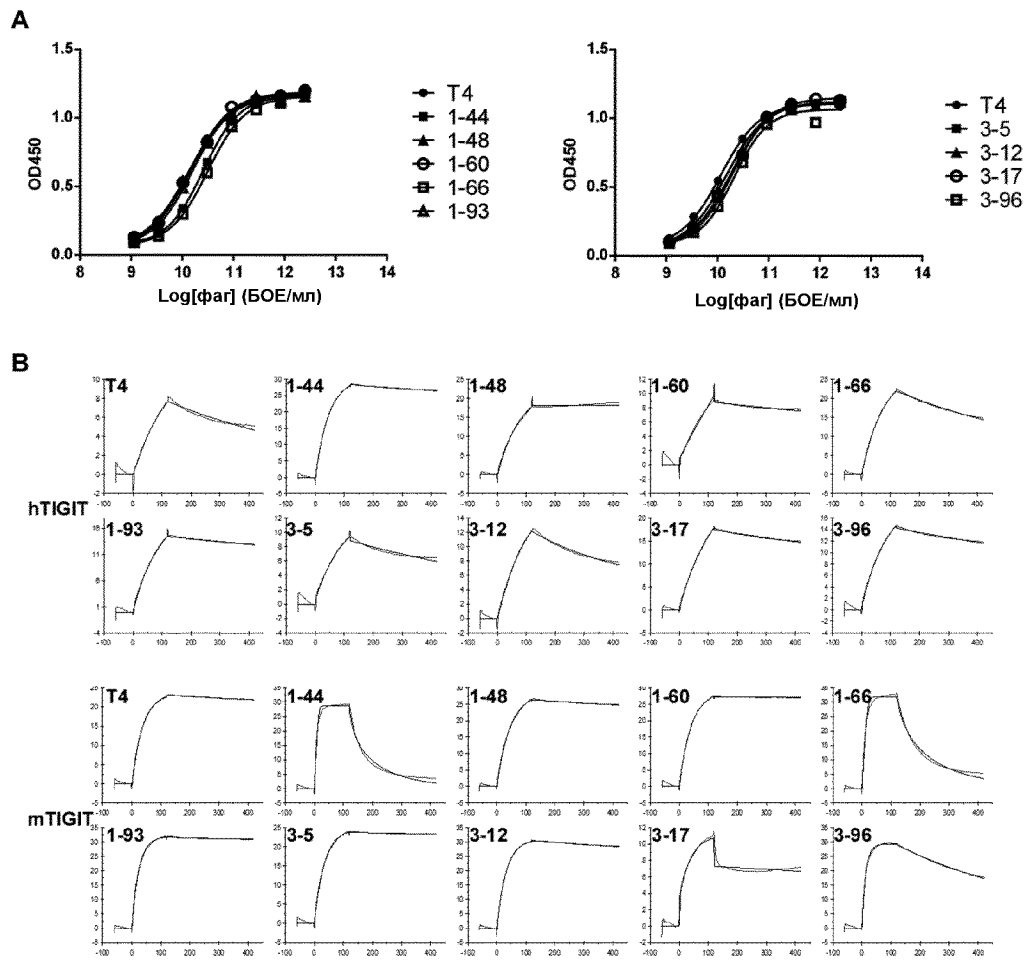


ФИГ. 3

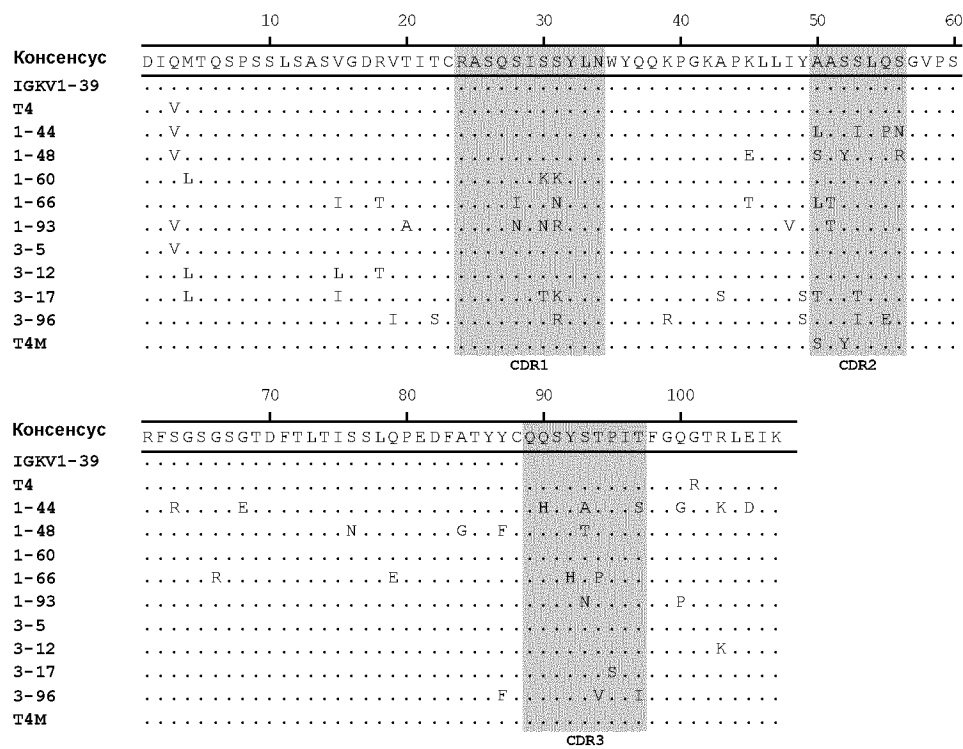


Антиген	Антитело (hlgG1)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (M)
hTIGIT	T4	1.82E+05	4.55E-03	2.50E-08
	hm7	5.63E+04	3.37E-03	5.99E-08
mTIGIT	T4	1.40E+05	4.55E-04	3.24E-09
	hm7	4.55E+04	5.34E-02	1.17E-06

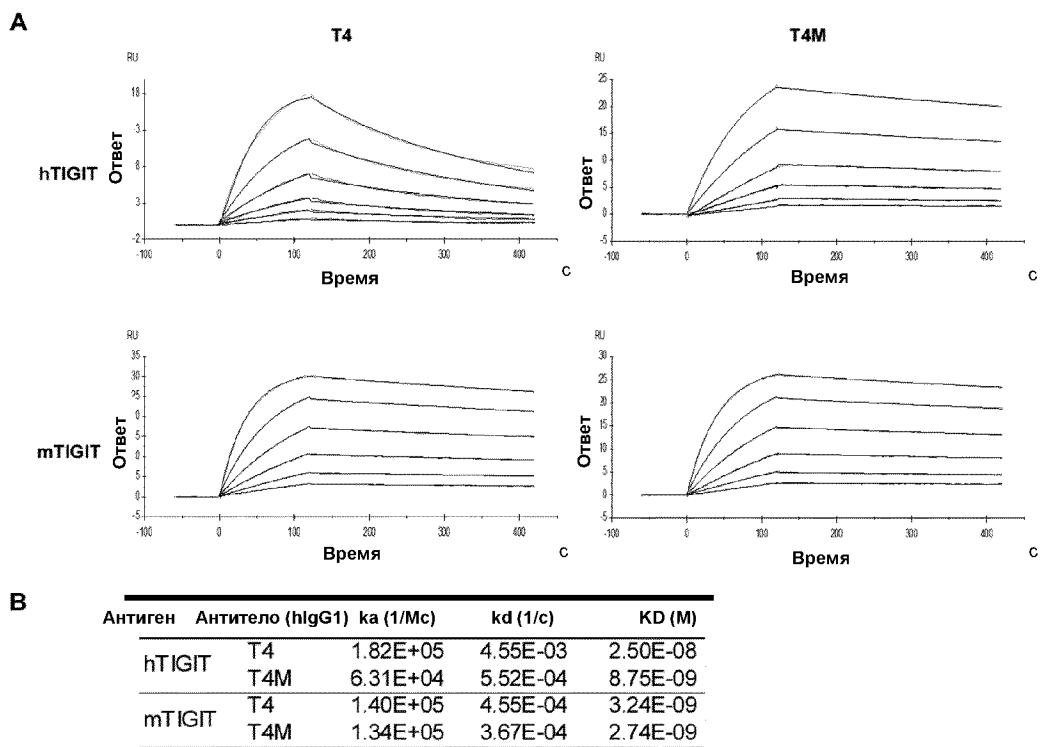
ФИГ. 4



ФИГ. 5

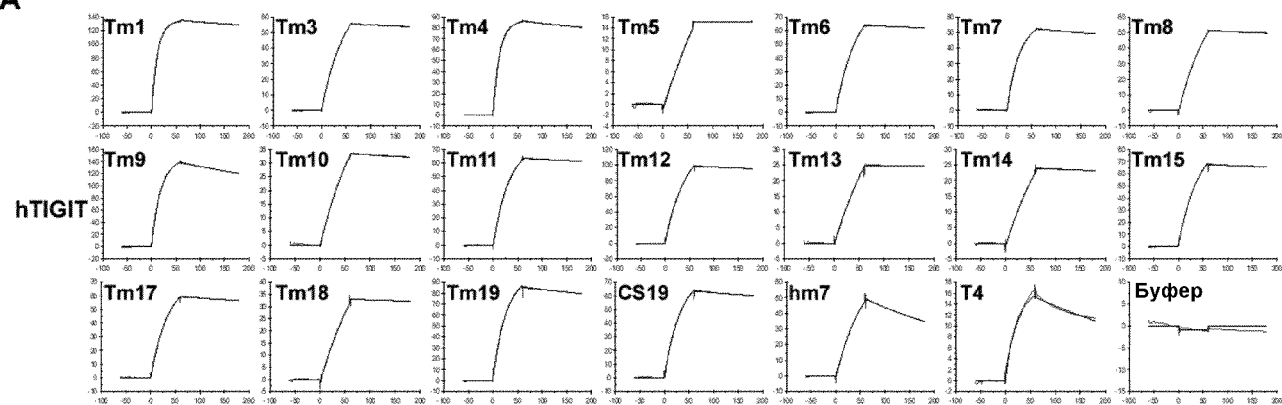


ФИГ. 6

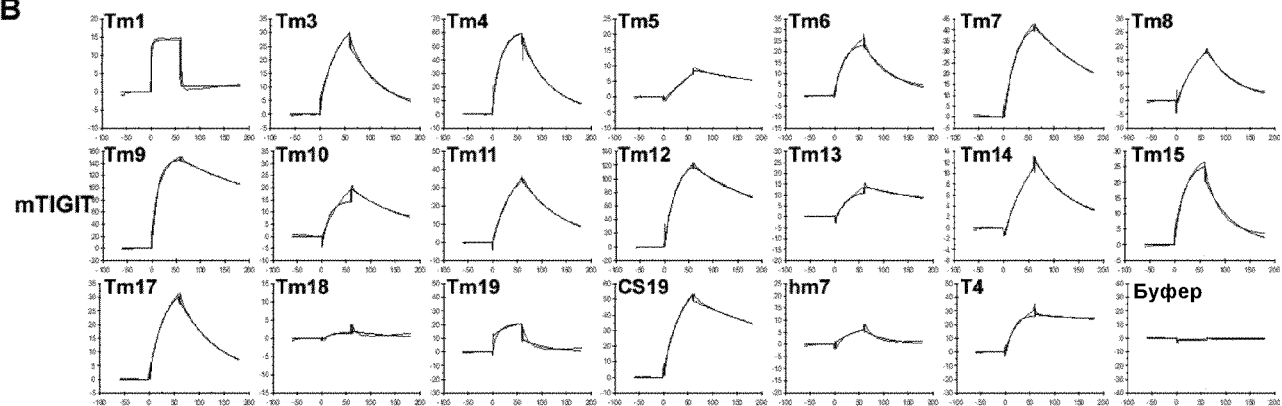


ФИГ. 7

A



B

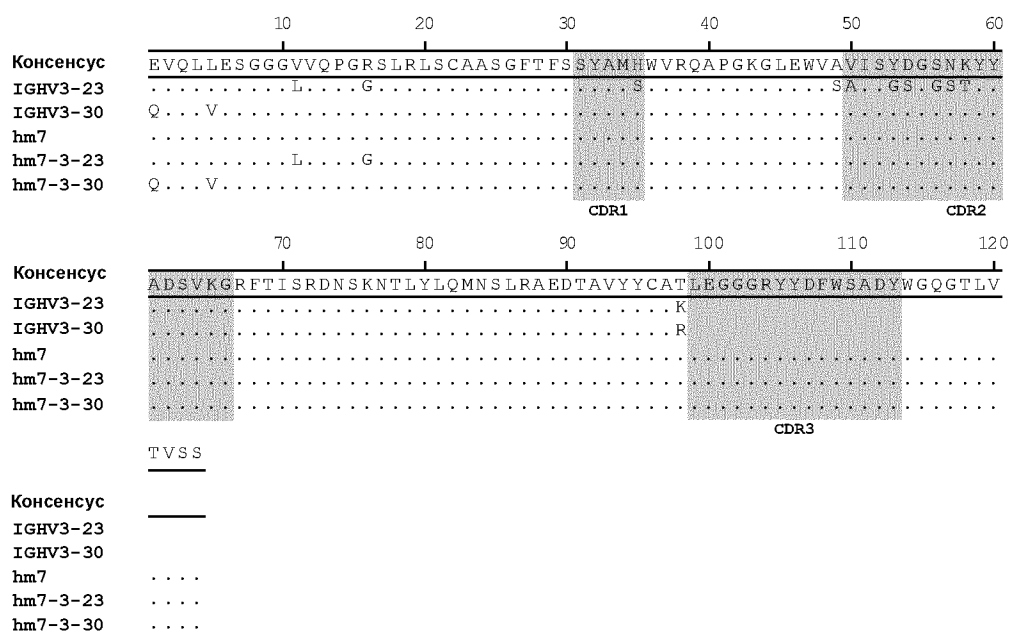


ФИГ. 8

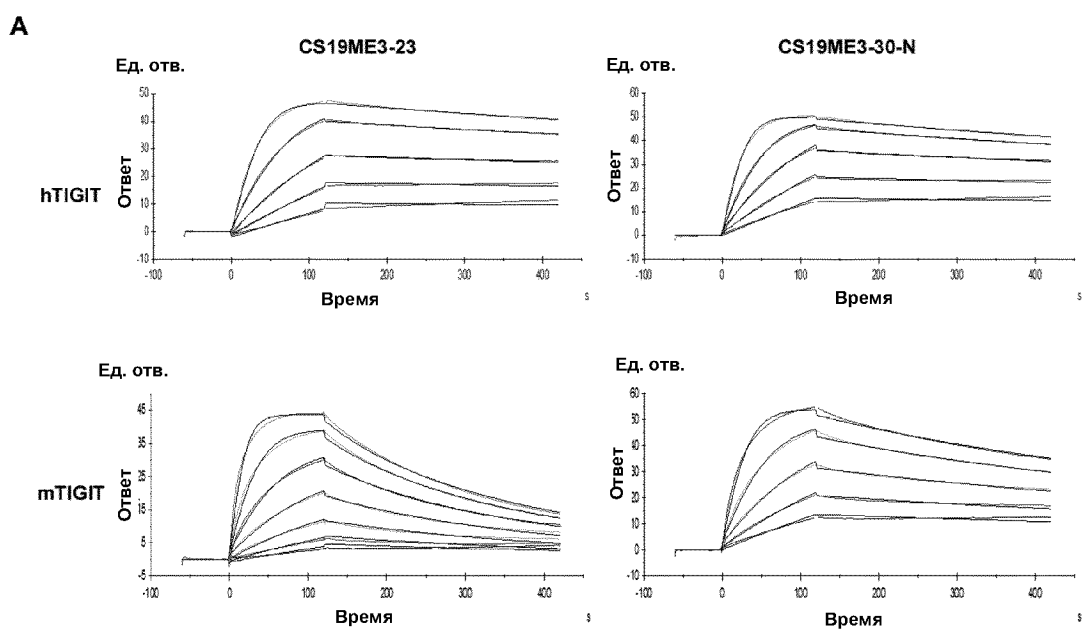
	10	20	30	40	50	60
Консенсус	QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGGYNFVSWYQQHPGKAPKLMIEVSKRPSGV					
IGLV2-11				Y		D
IGLV2-14	A	I		Y		N
hm7	A	I				D
Tm1			SI	R	P	V
Tm3	P	A		G	HD	D
Tm4	A	A	I	S	S	L
Tm5		E			D	V
Tm6	AG				D	L
Tm7	P	A		G	HD	D
Tm8		I		Y	Y	V
Tm9	A	I		Y	HN	L
Tm10	PV	A	I	H		
Tm11	P	A		NR		Y
Tm12	A		S	R		Y
Tm13	P	A				I
Tm14	P	A	V		D	L
Tm15	P	A				I
Tm17						
Tm18				R	D	I
Tm19	P	A				R
CS19						A
CS19ME						L
CS19ME-N						L
	CDR1			CDR2		

	70	80	90	100	110	
Консенсус	PDRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYS-SGSTRLVFGGGTKLTVL					
IGLV2-11						
IGLV2-14	SN					
hm7	SN		H	RS	S	
Tm1		S			HQS	
Tm3		V	T	A	SGAT	
Tm4	S		SD	SH	TS	
Tm5					MTG	
Tm6	A		T	H	S	
Tm7	A	DT		P	R	
Tm8	TN				RG	
Tm9	SS		D		R	
Tm10		V			A	
Tm11	A	F	V	LS	H	
Tm12	S			Q	ARP	
Tm13					MTG	
Tm14					N	
Tm15		V			G	
Tm17	A		P		T	
Tm18	SS		S		A	
Tm19		V	I		A	
CS19					N	
CS19ME					E	
CS19ME-N					E	
	CDR3					

ФИГ. 9



ФИГ. 10

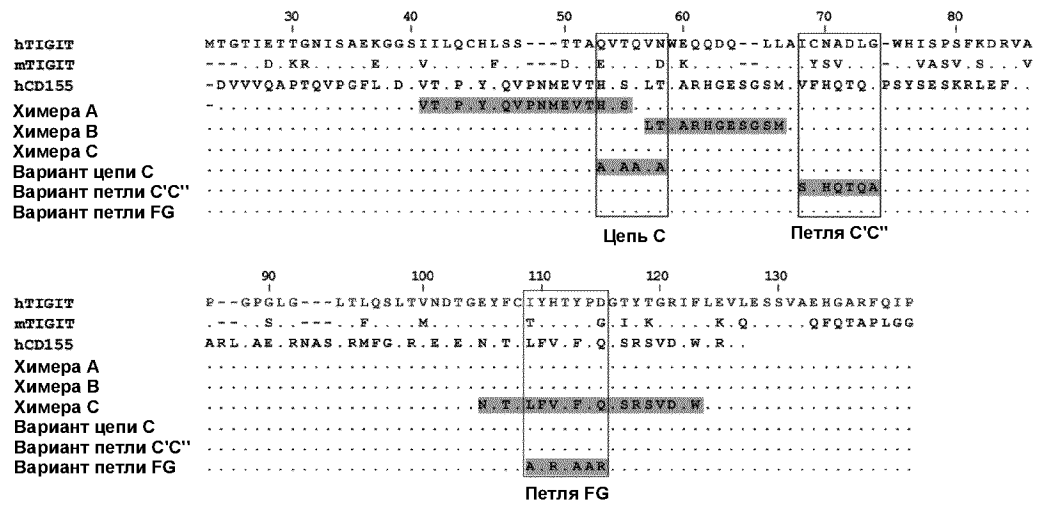


B

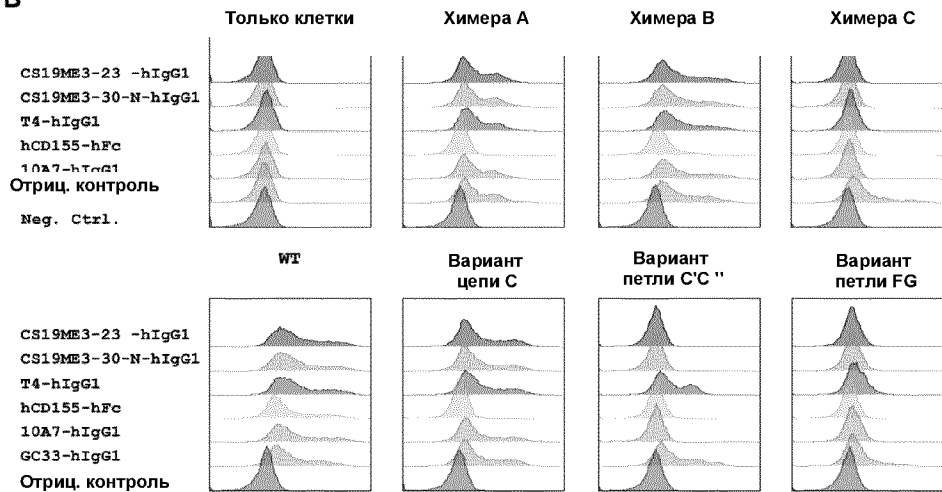
Антиген	Антитело	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (М)
hTIGIT	CS19ME3-23	1.39E+05	4.85E-04	3.49E-09
	CS19ME3-30-N	1.81E+05	6.08E-04	3.36E-09
mTIGIT	CS19ME3-23	2.03E+05	4.38E-03	2.16E-08
	CS19ME3-30-N	4.88E+05	1.39E-03	2.85E-09

ФИГ. 11

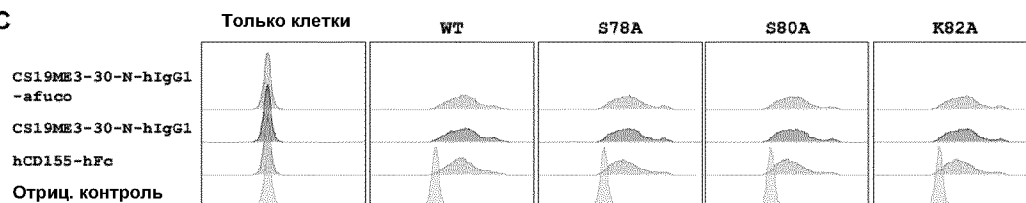
A



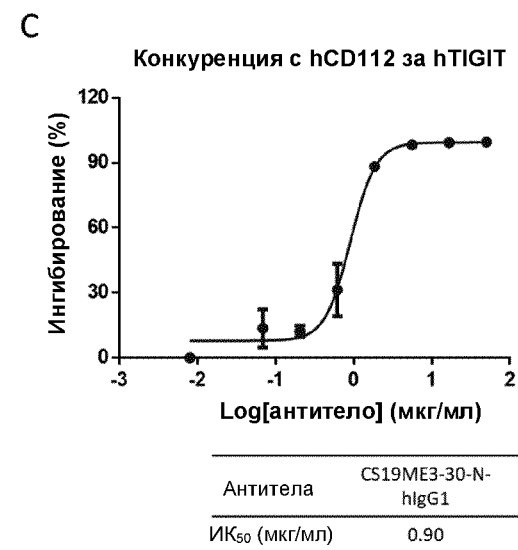
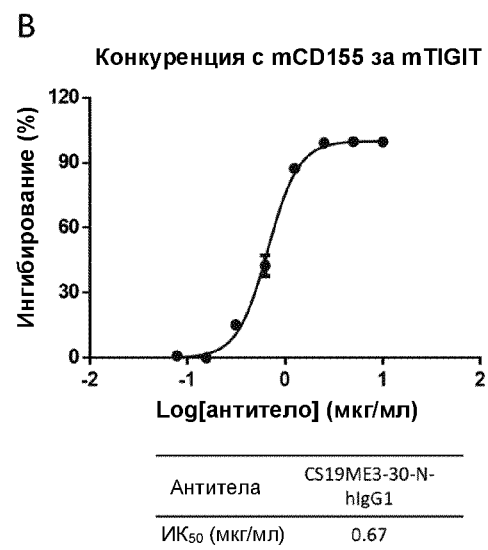
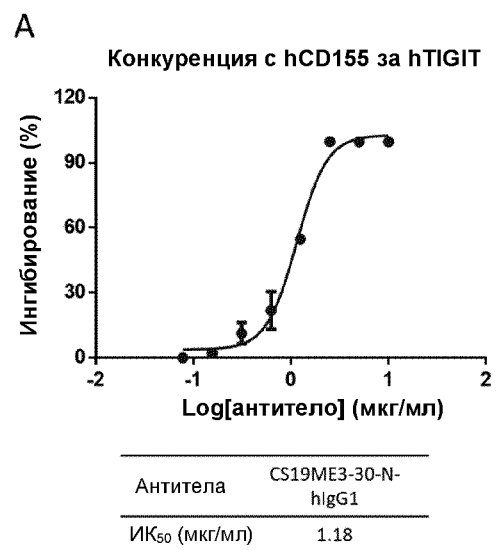
B



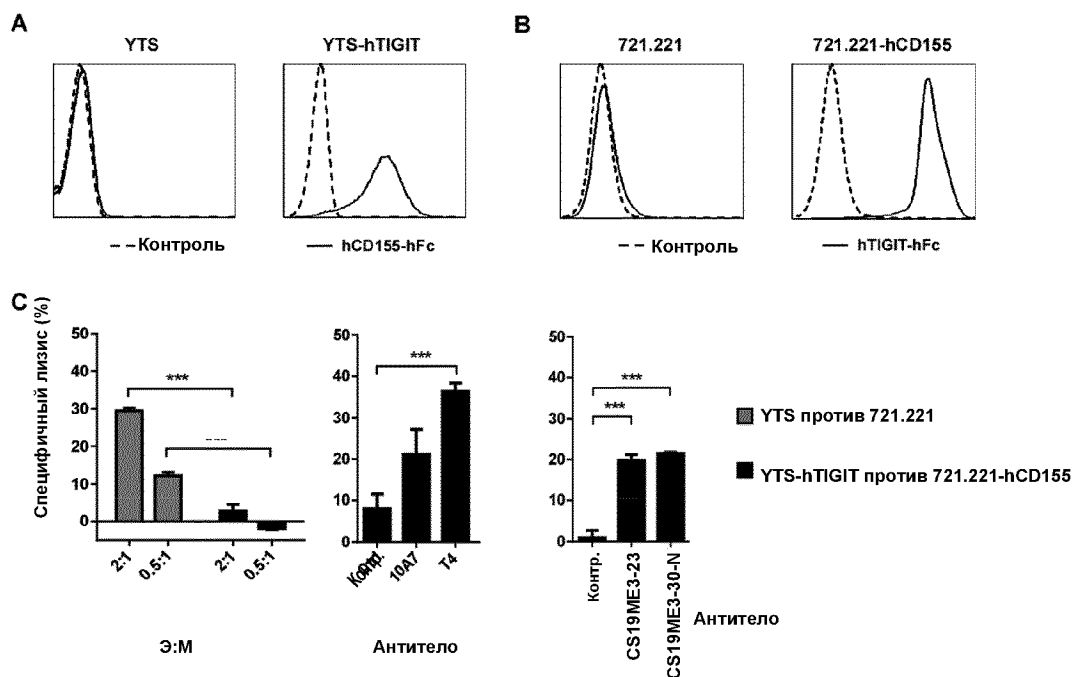
C



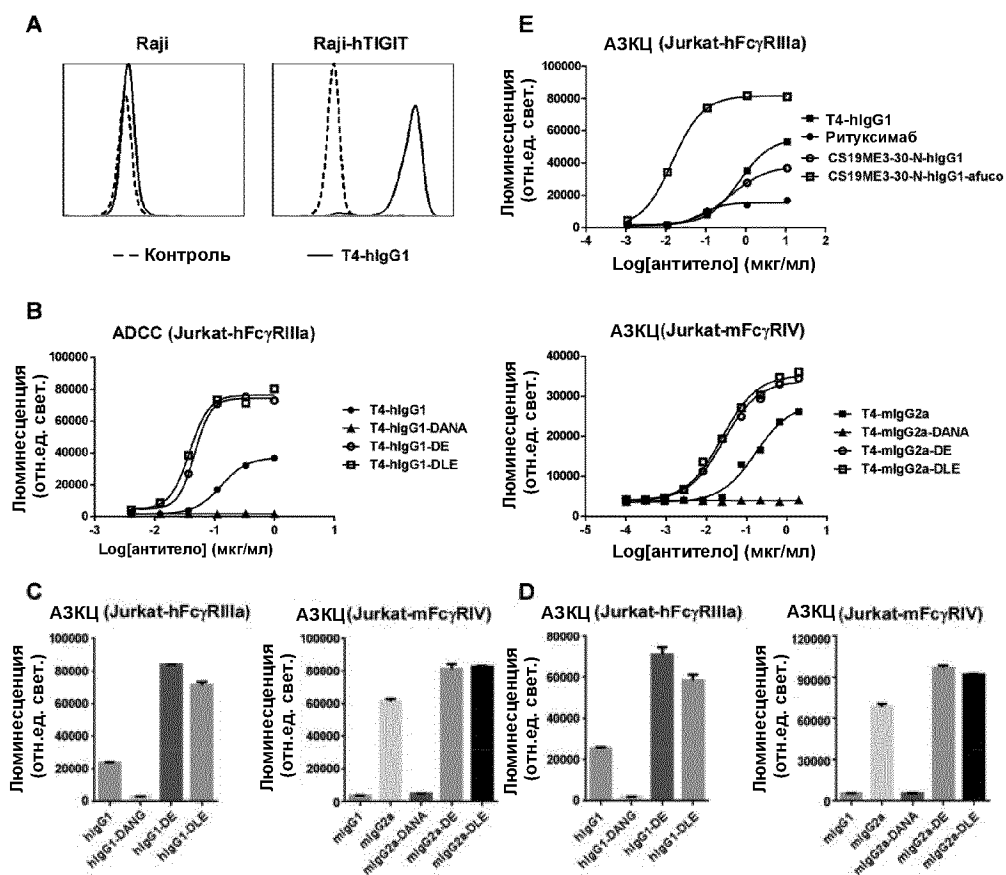
ФИГ. 12



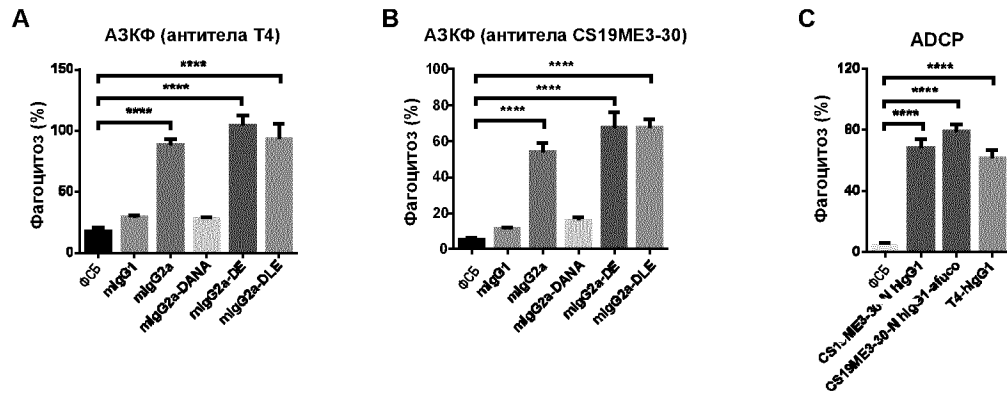
ФИГ. 13



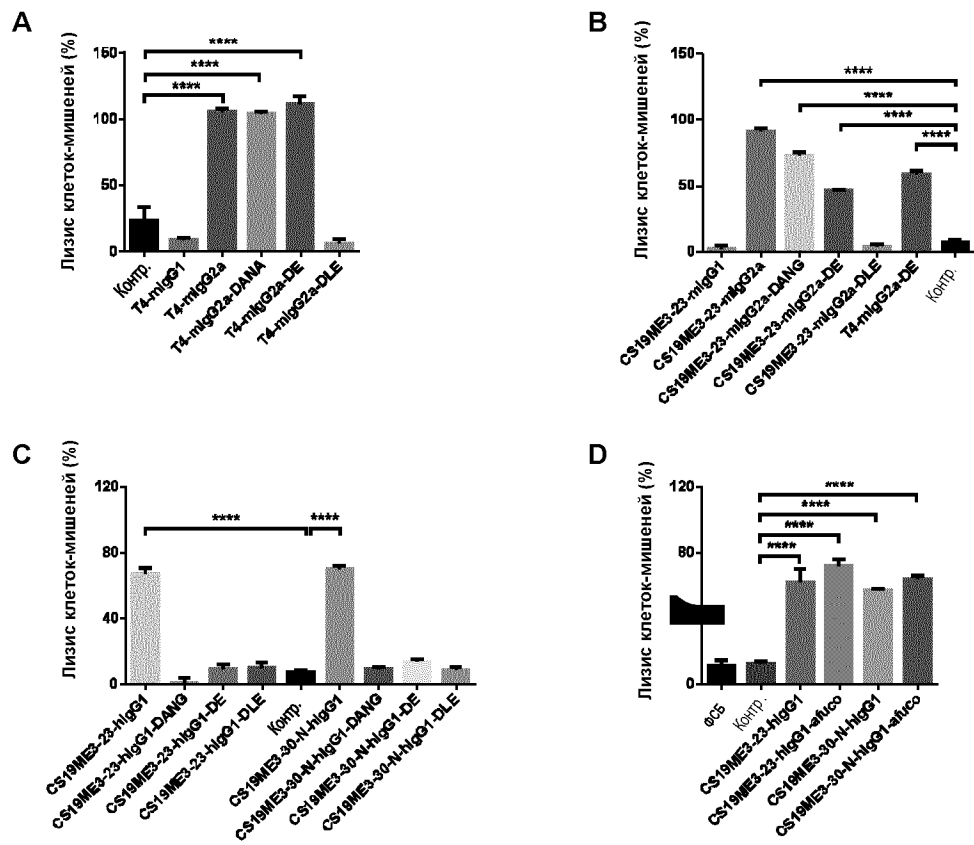
ФИГ. 14



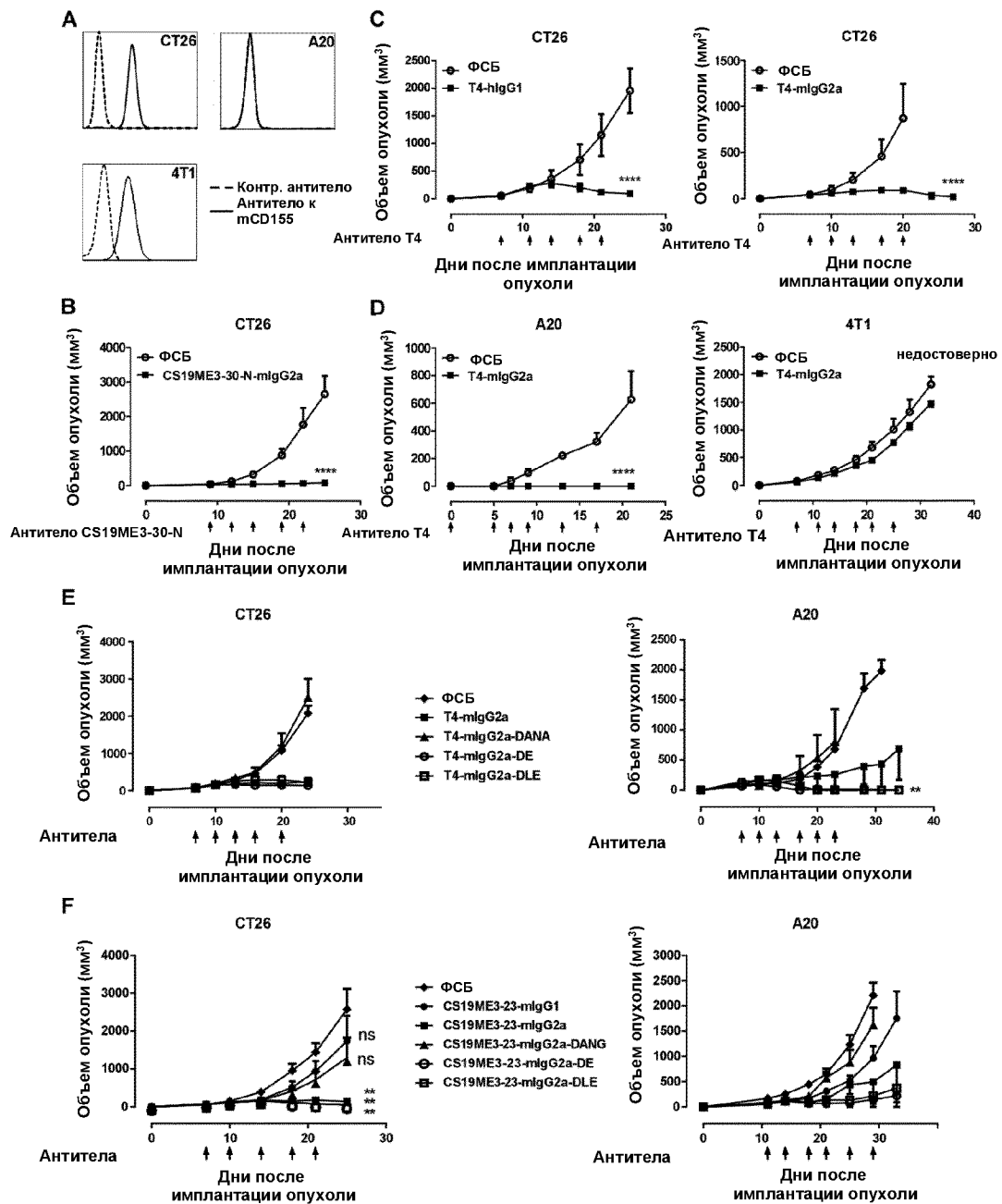
ФИГ. 15



ФИГ. 16



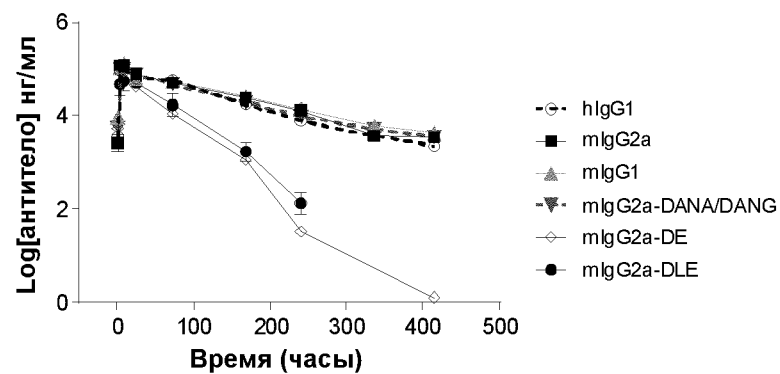
ФИГ. 17



ФИГ. 18

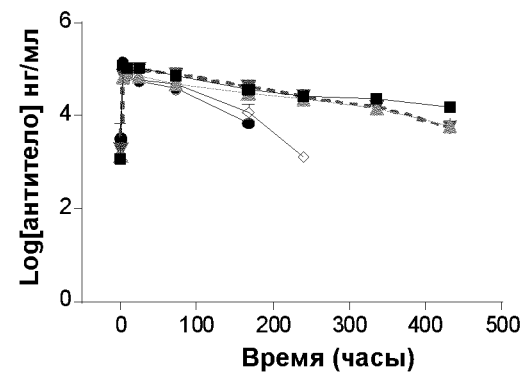
A

ФК антител Т4 у BALB/c



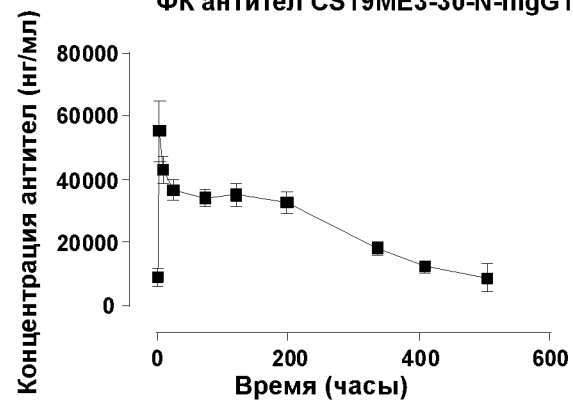
B

ФК антител CS19ME3-23 у BALB/c



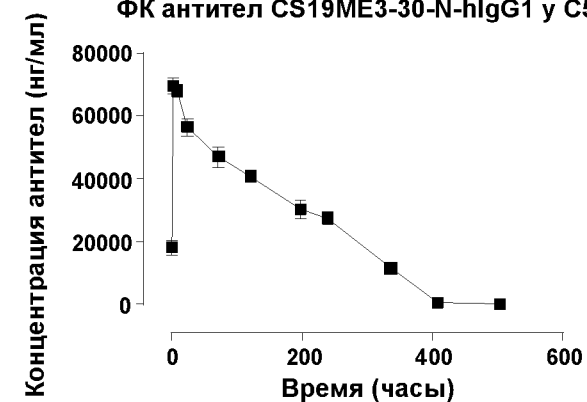
C

ФК антител CS19ME3-30-N-hlgG1 у C57

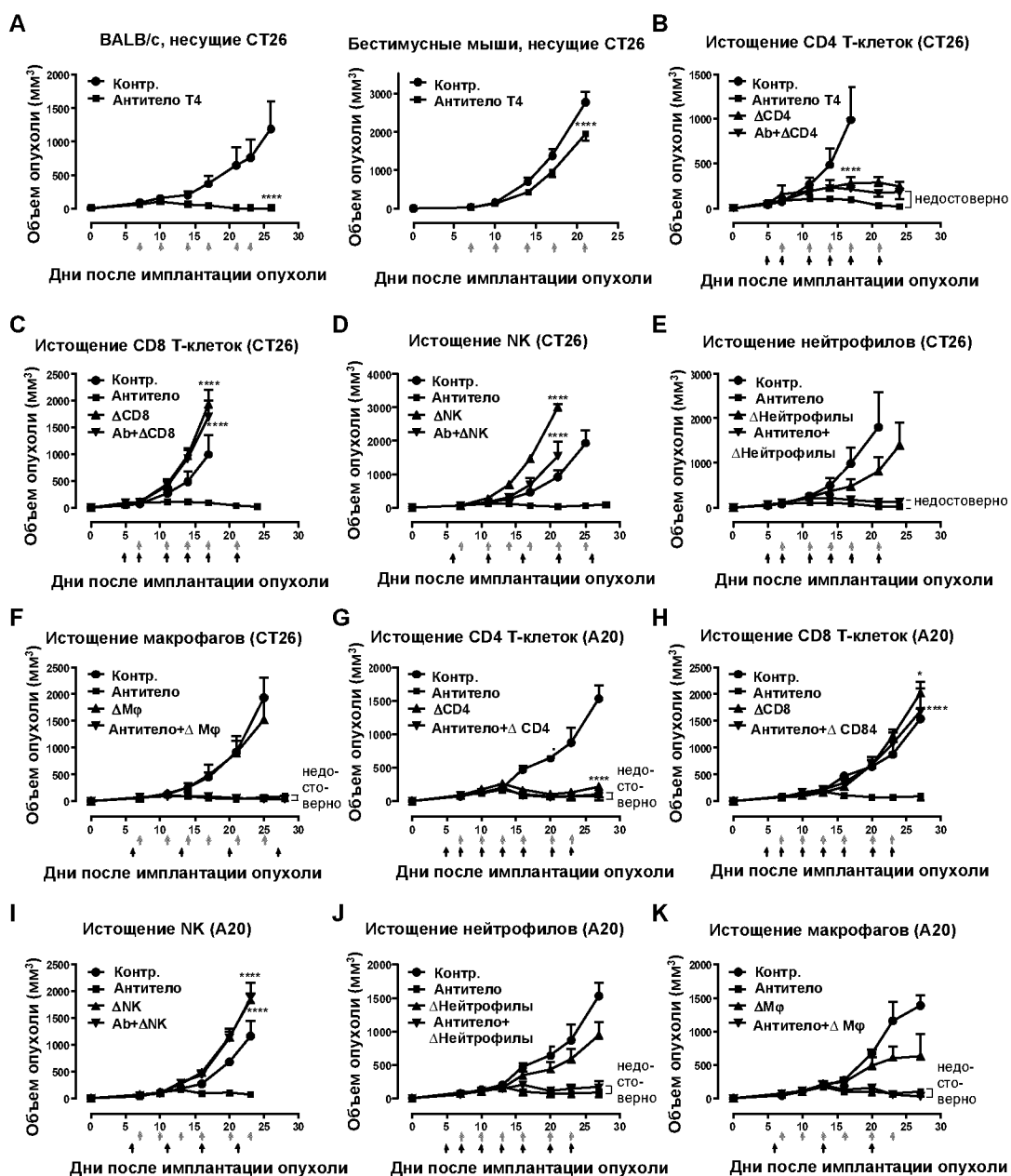


D

ФК антител CS19ME3-30-N-hlgG1 у C57-hFcRn

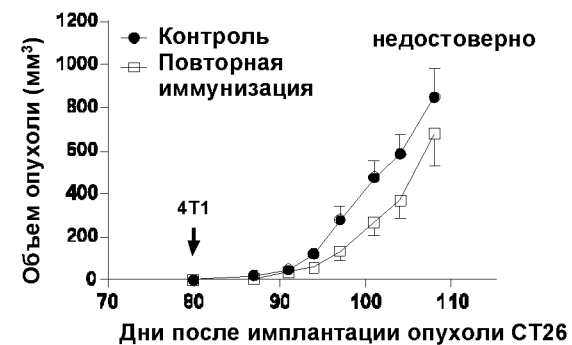
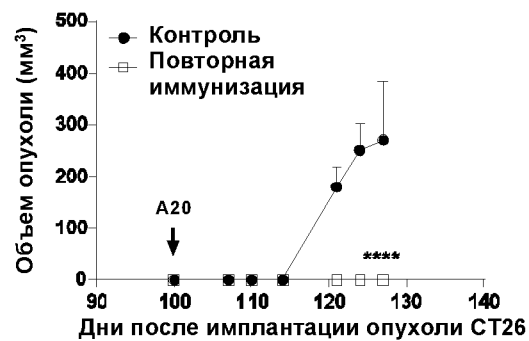
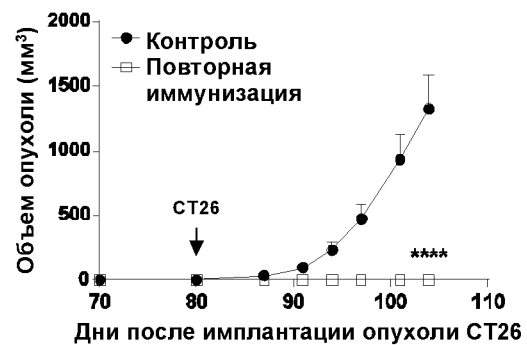


ФИГ. 19

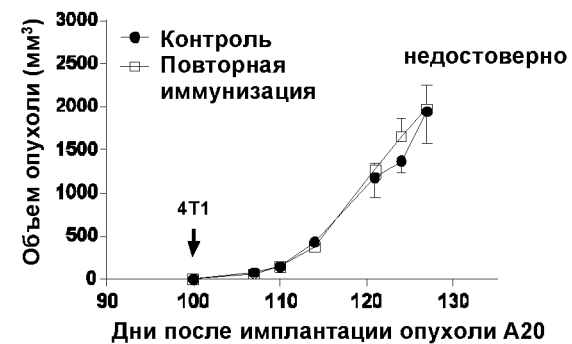
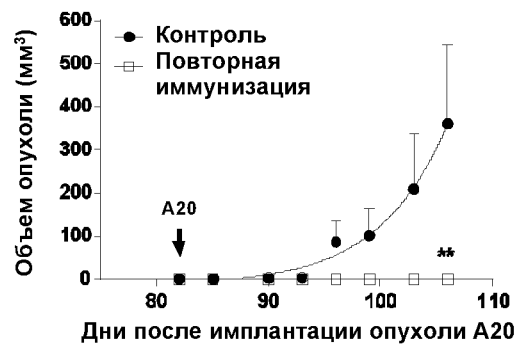
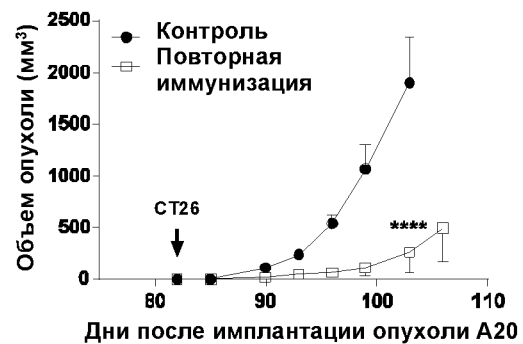


ФИГ. 20

A

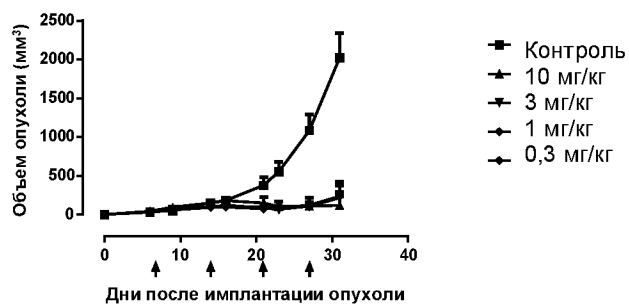


B



ФИГ. 21

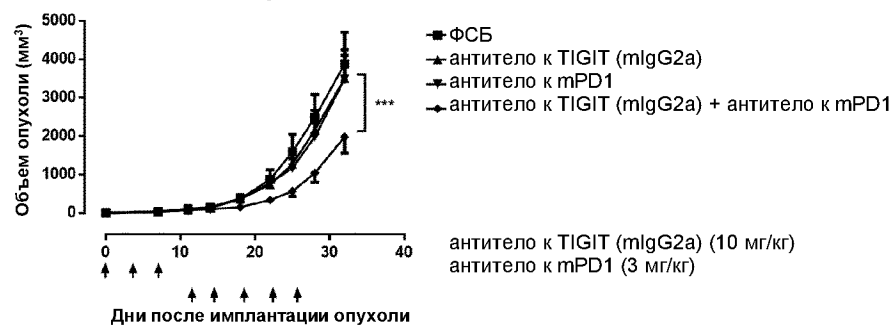
BALB/c, несущие CT26



ФИГ. 22

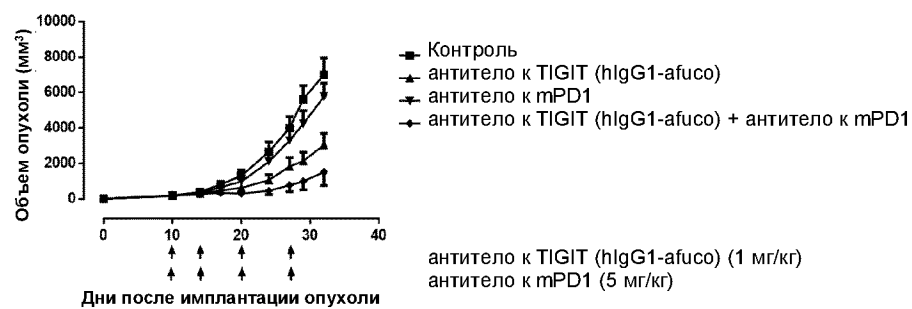
А

C57, несущие MC38



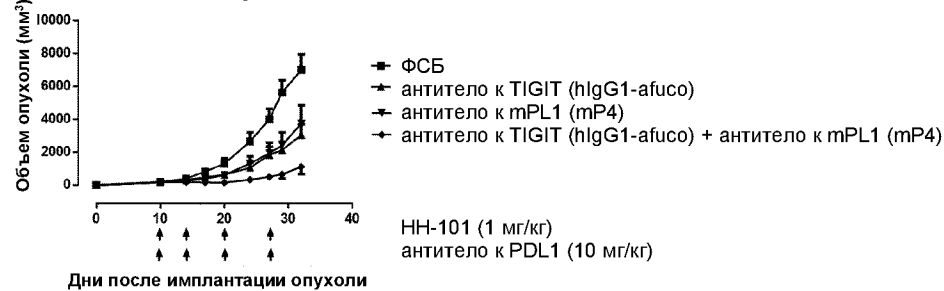
В

BALB/c, несущие CT26



С

BALB/c, несущие CT26



ФИГ. 23