

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202390338 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.05.16

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.07.14

(54) БЛОКАДА TIGIT И CD112R

(31) 63/052,011; 63/212,315

(32) 2020.07.15; 2021.06.18

(33) US

(86) PCT/US2021/041625

(87) WO 2022/015853 2022.01.20

(88) 2022.05.12

(71) Заявитель:
ЭМДЖЕН ИНК. (US)

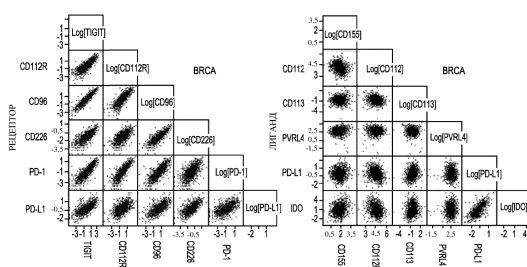
(72) Изобретатель:

Сон Сю Дж., Мок Марисса, Фолтц
Ян Невин, Келчевска Агнешка,
Манчуленко Кэти, Бюллер Янник,
Минь Сяошань (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В изобретении предусмотрены TIGIT-связывающие белки, CD112R-связывающие белки и их комбинации. Также предусмотрены композиции, содержащие TIGIT-связывающие белки и CD112R-связывающие белки, необязательно дополнительно содержащие PD-1-связывающие белки. Дополнительно, предусмотрены родственные конъюгаты, слитые белки, нуклеиновые кислоты, векторы, клетки-хозяева и наборы. Кроме того, предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие TIGIT-связывающий белок, CD112R-связывающий белок или их комбинацию, необязательно дополнительно содержащие антигенсвязывающий белок, связывающий PD-1, или конъюгат, слитый белок, нуклеиновую кислоту, вектор или клетку-хозяина, и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество, и способы лечения субъектов, нуждающихся в этом.



A1

202390338

202390338

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577058EA/072

БЛОКАДА TIGIT И CD112R

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящим заявляется приоритет согласно §119(e) раздела 35 U.S.C. по предварительной заявке на патент США № 63/052011, поданной 15 июля 2020 года, и по предварительной заявке на патент США № 63/212315, поданной 18 июня 2021 года, и их раскрытие настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ МАТЕРИАЛА, ПОДАННОГО В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

[0002] Машиночитаемый перечень нуклеотидных/аминокислотных последовательностей, включенный посредством ссылки во всей своей полноте, подается одновременно с настоящей заявкой и обозначен следующим образом: файл в формате ASCII (текстовый) размером 5,22 МБ под названием "A-2443-WO-PCT_Seq_Listing.txt"; созданный 28 июня 2021 года.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Сигнальная ось PD-1/PD-L1 участвует в подавлении Т-клеточных иммунных ответов при раке. Антагонисты данного пути прошли клиническую валидацию при ряде показаний, представляющих собой солидные опухоли. Ниволумаб и пембролизумаб являются двумя такими ингибиторами, которые нацеливаются на путь PD-1, и каждый из них был одобрен Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA) для лечения метастатической меланомы. Недавно исследователи протестировали парадигму ингибирования контрольных точек при других типах опухолей. Хотя были достигнуты некоторые успехи, терапия путем ингибирования контрольных точек все еще остается в тени других вариантов лечения рака.

[0004] Исследования ингибиторов контрольных точек в комбинации с другими средствами проводятся в настоящее время или недавно были завершены. Комбинацию ниволумаба и ипилимумаба, антитела, блокирующего рецептор CTLA-4, например, тестировали в клиническом испытании фазы III с участием пациентов с неоперабельной меланомой III или IV стадии. В данном исследовании процентная доля пациентов, достигших полного ответа, была наивысшей среди тех, кто получал комбинацию ниволумаба и ипилимумаба, что превосходит результат, продемонстрированный в группе, получавшей одно из двух лекарственных средств отдельно. Однако ответ на средства иммунотерапии, которые блокируют рецепторы контрольных точек CTLA-4 и PD-1, не является универсальным, и было идентифицировано множество механизмов, посредством которых опухоли ускользают от ответа. В качестве подхода к повышению общей эффективности и ограничению устойчивости опухоли комбинированные средства терапии, нацеливающиеся на несколько путей, представляют собой рациональный следующий шаг.

[0005] Существует потребность в безопасных и эффективных комбинированных

средствах терапии, нацеливающихся на несколько путей ингибиторов контрольных точек.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0006] В данном документе представлены данные, демонстрирующие индукцию TIGIT и CD112R на активированных Т-клетках человека и TIL (лейкоцитах, инфильтрирующих опухоль) в первичных опухолевых тканях человека, а также данные, подтверждающие высокие уровни коэкспрессии лигандов TIGIT и CD112R (CD155 и CD112) на опухолевых клетках. Данные, представленные в данном документе, подтверждают, что хотя блокирование одиночного взаимодействия TIGIT или CD112R с его лигандом приводит к повышению активности первичных Т-клеток человека, одновременная блокада обоих рецепторов (TIGIT и CD112R) от связывания с соответствующими лигандами приводит к значительному повышению активности первичных Т-клеток человека. Кроме того, данные подтверждают, что блокада и третьего взаимодействия с участием PD-1 и его лиганда, в дополнение к блокаде взаимодействий TIGIT и CD112R, приводит к значительному повышению общей активности первичных Т-клеток человека. Повышение активности, достигаемое при блокаде всех трех молекул (PD-1, TIGIT, CD112R), превосходит повышение, которое достигается при одиночной блокаде (только TIGIT или только CD112R) и двойной блокаде (блокада как TIGIT, так и CD112R, как TIGIT, так и PD-1, или как CD112R, так и PD-1).

[0007] Соответственно, настоящее изобретение предусматривает антигенсвязывающие белки, связывающие TIGIT (например, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты), антигенсвязывающие белки, связывающие CD112R (например, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты), и их комбинации. Настоящее изобретение дополнительно предусматривает композиции, содержащие антигенсвязывающие белки, связывающие TIGIT, антигенсвязывающие белки, связывающие CD112R, и антигенсвязывающие белки, связывающие PD-1. В определенных вариантах осуществления композиции содержат антитело к TIGIT или его TIGIT-связывающий фрагмент, и/или антитело к CD112R или его CD112R-связывающий фрагмент, и/или антитело к PD-1 или его PD-1-связывающий фрагмент. В предпочтительных вариантах осуществления композиция содержит антитело к TIGIT и антитело к CD112R. В данном документе предусмотрены родственные конъюгаты, слитые белки, нуклеиновые кислоты, векторы, клетки-хозяева и наборы.

[0008] Настоящее изобретение также предусматривает фармацевтические композиции, содержащие антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, или их комбинации, необязательно дополнительно содержащие антигенсвязывающий белок, связывающий PD-1, или конъюгат, слитый белок, нуклеиновую кислоту, вектор или клетку-хозяина и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество. В предпочтительных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит антитело к TIGIT и антитело к CD112R в соотношении 1:1.

[0009] Предусмотрены способы получения антигенсвязывающих белков. Также

предусмотрены способы лечения субъектов, нуждающихся в этом, включающие введение субъекту фармацевтической композиции по настоящему изобретению.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0010] На фигуре 1A представлена серия диаграмм, демонстрирующих профили коэкспрессии клеток с указанным признаком опухоли. В верхнем ряду показана коэкспрессия представителей семейства TIGIT друг с другом и с PD-1. В нижнем ряду показана коэкспрессия лигандов представителей семейства TIGIT друг с другом и с PD-1.

[0011] На фигуре 1B представлена серия диаграмм, демонстрирующих экспрессию TIGIT, CD112R, CD226 или PD-1 (данные основаны на данных секвенирования РНК одиночных клеток).

[0012] На фигуре 1C представлена серия диаграмм FACS, демонстрирующих коэкспрессию TIGIT, CD112R и PD-1.

[0013] На фигуре 1D представлена таблица, в которой перечислены % CD4 Т-клеток, CD8 Т-клеток или естественных клеток-киллеров (NK), положительных в отношении экспрессии CD112R, TIGIT или PD-1 в Т/NK-клетках, инфильтрирующих опухоль.

[0014] На фигуре 1E представлена серия диаграмм, демонстрирующих экспрессию Ерсат, CD45, CD112, CD155, CD11c и CD11b в опухоли по сравнению с PBMC. Экспрессию CD112 и CD155 или экспрессию CD11c и CD11b оценивали в Ерсат⁺, CD45⁺ Ерсат⁺ или CD45⁺ Ерсат⁻ популяциях.

[0015] На фигуре 2A представлена иллюстрация репортерного анализа гена (RGA) Jurkat. В системе анализа используют сконструированные клетки CHO, которые стабильно экспрессируют активатор CD112 и CD3, и очищенные пан-Т-клетки человека, предварительно активированные антителами к CD3/CD28. Когда CD112R, экспрессируемый на поверхности Т-клеток, связывается с CD112, экспрессируемым на поверхности клеток CHO, ожидается, что высвобождение IL-2 будет подавляться.

[0016] На фигуре 2B представлены графики, демонстрирующие повышение экспрессии CD112R активированных Т-клеток (справа) относительно неактивированных Т-клеток (слева). Профили окрашивания CD112R показаны по отношению к изотипическому контролю.

[0017] На фигуре 2C представлен график, демонстрирующий связывание между антителами или лигандом с клетками CHO, экспрессирующими CD112R человека (представленное посредством геометрической средней кратности), построенный в виде зависимости от концентрации инструментальных антител (PL-52575, PL-52576 и PL-52577) или сопоставимых контрольных антител на основе IgG человека или мыши (изотипа HuIgG и изотипа MuIgG соответственно). Также показано связывание лиганда CD112.

[0018] На фигуре 2D представлен график, демонстрирующий расчетный % ингибирования связывания между лигандом и CD112R человека, экспрессируемым на клетках CHO, построенный в виде зависимости от концентрации инструментальных

антител (PL-52575, PL-52576 и PL-52577) или сопоставимых контрольных антител на основе IgG человека или мыши (изотипа HuIgG и изотипа MuIgG соответственно).

[0019] На фигуре 2Е представлен график концентрации IL-2 (пг/мл), построенный в виде зависимости от концентрации инструментальных антител (PL-52575, PL-52576 и PL-52577) или сопоставимых контрольных антител на основе IgG человека или мыши (изотипа HuIgG и изотипа MuIgG соответственно) при взаимодействии с клетками CHO, трансфицированными вектором без вставки (вектор) или вектором, кодирующим CD112 (CD112). Значение EC50 каждого инструментального антитела указано в таблице под осью X.

[0020] На фигуре 2F представлен график концентрации IL-2 (пг/мл), построенный в виде зависимости от концентрации антитела к CD226 или сопоставимого по изотипу контрольного антитела в анализе, в котором Т-клетки культивируют вместе с клетками CHO, трансфицированными вектором без вставки (вектор-CHO) или вектором, кодирующим CD112 (CD112-CHO). В одном примере показаны Т-клетки без какого-либо антитела.

[0021] На фигуре 3 представлена схема каскада скрининга, используемого для обнаружения антагонистических антител к CD112R.

[0022] На фигуре 4А представлена схема репортерного анализа гена (RGA) Jurkat. Клетки CHO, экспрессирующие активатор CD3 и CD112, культивируют вместе с Т-клетками Jurkat, экспрессирующими конструкцию NFAT-люцифераза и CD112R, в присутствии антител или контролей.

[0023] На фигуре 4В представлен график кратности индукции активности люциферазы, построенный для сборов 6-9.

[0024] На фигуре 4С представлен график активности связывания с первичными Т-клетками яванского макака, построенный для панели из 350 "попаданий" и для средств, положительных по связыванию.

[0025] На фигуре 5А представлена таблица, в которой перечислены характеристики сборов 1-3, и на фигуре 5В представлена таблица, в которой перечислены характеристики сборов 6-9.

[0026] На фигуре 6 представлен график относительной активности связывания для антител к CD112R с Kd, составляющей 100 пМ, в качестве произвольного порогового значения.

[0027] На фигуре 7А представлен график результатов разделения на клады, демонстрирующий разнообразие последовательностей антител.

[0028] На фигуре 7В представлена таблица, в которой перечислены иллюстративные значения EC50 указанных антител и информация о последовательности зародышевого типа и CDR3 HC.

[0029] На фигуре 8 представлен график % ингибирования связывания, достигнутого при применении указанного антитела или инструментального антитела (PL-52575, PL-52577). В качестве контролей используют нерелевантные мышинные и

человеческие антитела. В таблице под осью X перечислены значения EC50 и максимальный % ингибирования для каждого инструментального антитела.

[0030] На фигуре 9A представлен график сигнала во время различных стадий конкурентного анализа для трех сценариев: A2, B2 и F2, где A2 означает использование двух разных антител для определения того, конкурирует ли второе антитело с первым антителом за связывание с лигандом. B2 означает использование того же антитела, что и на протяжении всего анализа. F2 означает использование нерелевантного контрольного антитела.

[0031] На фигуре 9B представлена таблица, в которой перечислены антитела, которые конкурируют друг с другом (группа A) за связывание с лигандом, как определено посредством конкурентного анализа.

[0032] Культивируемые Т-клетки человека и РВМС макака-крабоеда инкубировали с антителами в различных концентрациях, начиная с 3 мкг/мл (в анализе с Т-клетками человека) или 5 мкг/мл (в анализе с РВМС макака-крабоеда). Антитела титровали в соотношении 1 к 3 для определения наиболее низкой концентрации 0,001 мкг/мл (в анализе с Т-клетками человека) и 0,002 мкг/мл (в анализе с РВМС макака-крабоеда). FCS Express использовали для получения геометрических средних значений, и Screener использовали для определения кратности по сравнению с изотипическим контролем, кривых титрования и значений EC50. На фигурах 10A и 10B представлен график кратности изотипического контроля, построенный в виде зависимости от концентрации указанного антитела. Результаты анализа с использованием РВМС макака-крабоеда и Т-клеток человека показаны на фигурах 10A и 10B соответственно. На графиках с фигур 10A и 10B представлена кратность сигнала изотипического контроля, нанесенная на график в виде зависимости от log концентрации указанного антитела.

[0033] На фигуре 11A представлен график активности люциферазы NFAT, построенный в виде зависимости от концентрации указанного антитела. На фигуре 11B представлена таблица, в которой перечислены значения EC50 антитела, определенные в RGA Jurkat.

[0034] На фигуре 12A представлен график % ингибирования связывания TIGIT с CD155-Fc, построенный в виде зависимости от концентрации инструментального антитела к TIGIT. На фигуре 12B представлен график % ингибирования связывания с CD112-Fc в виде зависимости от концентрации антитела.

[0035] На фигуре 12C представлена иллюстрация клеточного анализа для тестирования активности антител к TIGIT. На фигуре 12D представлен график связывания CD226-Fc с различными клетками с фигуры 12C без каких-либо антител. На фигуре 12E представлен график связывания CD226-Fc в присутствии указанной концентрации инструментального антитела или контрольного антитела.

[0036] На фигуре 12F представлен график концентрации IFN γ , образуемого Т-клетками в присутствии указанной концентрации инструментального антитела или контрольного антитела. На фигуре 12G представлен график зависимости активности

люциферазы NFAT, индуцированной в присутствии указанной концентрации инструментального антитела или контрольного антитела, от концентрации.

[0037] На фигуре 12H представлен график связывания в присутствии указанной концентрации инструментального антитела или контрольного антитела. 1F4 представляет собой инструментальное антитело, подобное 10A7 и MBSA43. На фигуре 12I представлена серия диаграмм, демонстрирующих активность связывания указанного антитела с первичными предварительно активированными Т-клетками яванского макака относительно изотипического контроля.

[0038] На фигуре 13 представлена схема скрининговых анализов, используемых для обнаружения антител к TIGIT.

[0039] На фигуре 14A представлена схема репортерного анализа гена (RGA) Jurkat. Клетки CHO, экспрессирующие активатор CD3 и CD155, культивируют вместе с Т-клетками Jurkat, экспрессирующими конструкцию NFAT-люцифераза и TIGIT, в присутствии антител или контролей. На фигуре 14B представлен график активности NFAT-люциферазы, индуцированной в присутствии указанного антитела TIGIT, или инструментального антитела (MBSA43), или контрольного антитела (изотипический контроль, представляющий собой IgG4 человека, изотипический контроль, представляющий собой IgG2 человека, изотипический контроль, представляющий собой мышинный IgG1).

[0040] На фигуре 14C представлен график $IFN\gamma$, образуемого Т-клетками в присутствии указанного антитела к TIGIT, или инструментального антитела (MBSA43), или контрольного антитела (изотипический контроль, представляющий собой IgG человека, изотипический контроль, представляющий собой мышинный IgG1).

[0041] На фигуре 15 представлен график активности люциферазы, индуцированной в присутствии указанного антитела к TIGIT (AB1 или AB2) или инструментального антитела (MBSA43) в Т-клетках Jurkat, трансфицированных репортерной конструкцией IL-2-люцифераза и TIGIT. Один набор клеток конструировали таким образом, чтобы нокаутировать экспрессию CD226 (CD226KO).

[0042] На фигуре 16A представлена схема анализа высвобождения $IFN\gamma$ с использованием Т-клеток, экспрессирующих TIGIT, CD226 и CD112R, и клеток CHO, экспрессирующих CD155, CD112 и scFV к CD3. На фигуре 16B представлен график высвобождения $IFN\gamma$ в присутствии указанных комбинаций антител. HuIgG1 и mIgG1 представляют собой сопоставимые по изотипу контрольные антитела. Инструментальные антитела к CD112R предусматривают PL-52577.

[0043] Каждая из фигур 17A-17C представляет собой график высвобождения $IFN\gamma$ в присутствии указанных комбинаций антител из 2 или трех антител или одного антитела. 3x=комбинация антител к PD-1, к TIGIT и к CD112R. На фигуре 17D представлен график ожидаемых результатов анализа высвобождения $IFN\gamma$ для указанной комбинации антител или для одного антитела по сравнению с наблюдаемыми результатами.

[0044] На фигуре 17E представлен график высвобождения $IFN\gamma$ в присутствии

указанных комбинаций антител из 2 или трех антител или одного антитела в анализе диссоциированных опухолевых клеток человека. Показана концентрация IFN γ в надосадочной жидкости, собранной в день 3 по сравнению с днем 6.

[0045] На фигуре 17F представлен график % клеток, положительных в отношении экспрессии указанных молекул в CD4 Т-клетках в PBMC или опухолевых клетках. На фигуре 17G представлен график % клеток, положительных в отношении экспрессии указанных молекул в CD8 Т-клетках в PBMC или опухолевых клетках.

[0046] На фигуре 17H представлен график % клеток, положительных в отношении экспрессии PD-1, в день 6 в культурах диссоциированных опухолевых клеток, где клетки обрабатывали антителом к TIGIT, антителом к CD112R или антителом изотипического контроля.

[0047] На фигуре 17I представлен график % клеток, положительных в отношении экспрессии TIGIT, в день 6 в культурах диссоциированных опухолевых клеток, где клетки обрабатывали антителом к PD-1, антителом к CD112R или антителом изотипического контроля.

[0048] На фигуре 18 представлена совокупность таблиц 2-5 и 12-19, на которые ссылаются в данном документе.

[0049] Каждая из фигур 19A и 19B представляет собой график количества IFN- γ (пг/мл), продуцируемого цитотоксическими Т-лимфоцитами при стимуляции составом, содержащим mAb к CD112R (24F1), mAb к TIGIT (43B7.002.015) и mAb к PD-1 в различных соотношениях, как указано. Общая концентрация антител в составах на фигурах 19A и 19B составляет 1,5 нМ и 30 нМ соответственно.

[0050] На фигурах 20A-20C представлены графики, относящиеся к экспрессии TIGIT, CD112R и лигандов CD155, CD112 и PDL1 в тканях первичной опухоли человека *ex vivo* и соответствующей крови, как определено посредством FACS-анализа. Процентные доли TIGIT⁺ и CD112R⁺ клеток в CD8⁺ Т-клетках и CD3-CD56⁺ NK-клетках среди CD45⁺ иммунных клеток в диссоциированных опухолевых тканях представлены в виде графика на фигуре 20A, и процентные доли TIGIT⁺ и CD112R⁺ клеток, экспрессируемых совокупными Т/NK, среди лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль (TIL), или в крови показаны на фигуре 20B. Экспрессию лиганда анализировали в подгруппе образцов, для которых процентные доли CD155-, CD112- и PD-L1-положительных клеток в опухолевых клетках ЕрсамНI показаны на фигуре 20C. Соединяющие линии указывают на значения от отдельных доноров. Эти данные представляют собой совокупные результаты для опухолевых тканей по четырем показаниям (PANC, CRC, GIST и TNBC).

[0051] На фигуре 21 представлен график средней концентрации mAb в сыворотке крови, построенный в виде зависимости от времени после IV введения самцам яванских макаков. Линия с кружками обозначает среднюю концентрацию mAb к TIGIT в сыворотке крови животных группы 1, линия с квадратами обозначает среднюю концентрацию mAb к CD112R в сыворотке крови животных группы 1, линия с треугольниками (направленными

вверх) обозначает среднюю концентрацию mAb к TIGIT в сыворотке крови животных группы 2, и линия с треугольниками (направленными вниз) обозначает среднюю концентрацию mAb к CD112R в сыворотке крови животных группы 3.

[0052] На фигурах 22A-22D показано, что блокада CD112R+TIGIT приводит к аддитивному повышению активности первичных NK-клеток человека в отношении опухолевых клеток. На фигуре 22A представлен график % положительных NK-клеток-мишеней, где мишенями являются CD226, TIGIT, CD112R, PD-1 или CD96, демонстрирующий, что очищенные NK-клетки человека экспрессируют высокие уровни CD226, TIGIT и CD112R и низкие уровни PD-1 и CD96. На фигуре 22B представлен график % лиганд-положительных клеток, экспрессирующих CD155, CD112 или PDL1, и показаны опухолевые клетки-мишени, использованные в анализе (линия опухолевых клеток SKBR3), экспрессирующие высокие уровни CD155 и CD112 и низкий уровень PD-L1. На фигуре 22C представлен график степени уничтожения опухолевых клеток (относительно антитела изотипического контроля) очищенными NK-клетками человека, стимулированными антителом к PD-1, антителом к TIGIT, антителом к CD112R или комбинацией антитела к TIGIT и антитела к CD112R, или комбинацией антитела к PD-1, антитела к TIGIT и антитела к CD112R (3X). На фигуре 22D представлен график степени продуцирования IFN γ (относительно антитела изотипического контроля), стимулированного указанными смесями антител, содержащими антитело к PD-1, антитело к TIGIT, антитело к CD112R или комбинацию антитела к TIGIT и антитела к CD112R, или комбинацию антитела к PD-1, антитела к TIGIT и антитела к CD112R (3X). На фигурах 22C и 22D показано, что блокада только TIGIT или только CD112R приводила к повышению активности NK-клеток по сравнению с клетками, обработанными изотипическим антителом (HuIgG1) или антителом к PD-1, но блокада обоих TIGIT и CD112R приводила к аддитивному повышению как уничтожения опухолевых клеток, так и продуцирования IFN γ через 16 ч. Активность NK-клеток показана в виде кратного изменения по сравнению с изотипическим контролем. Каждое mAb добавляли при 10 мкг/мл.

[0053] Суспензию отдельных клеток, полученную из диссоциированной опухолевой ткани *ex vivo*, культивировали в присутствии указанных смесей антител, содержащих антитело к PD-1, антитело к TIGIT, антитело к CD112R или комбинацию антитела к TIGIT и антитела к CD112R, или комбинацию антитела к PD-1, антитела к TIGIT и антитела к CD112R (по 10 мкг/мл каждого), и активность T/NK-клеток измеряли по уровням IFN γ в надосадочной жидкости в день 3. На фигуре 23 представлен график повышения (относительно антитела изотипического контроля) ответа первичных TIL в диссоциированной опухолевой ткани *ex vivo*, демонстрирующий, что смесь, содержащая все три антитела, нацеливающиеся на CD112R+TIGIT+PD-1, в соотношении 1:1:1 стимулирует наиболее высокий ответ TIL. На этом графике показаны средние значения для 5 различных тканей и планки погрешностей, обозначающие SEM.

[0054] На фигурах 24A-24C представлены графики ответа роста опухоли с

течением времени в нескольких различных моделях опухолей у мышей. На фигуре 24А показан рост опухоли в сингенной модели опухоли CT26, где объем опухоли нанесен на график в виде зависимости от количества дней после имплантации опухоли у мышей дикого типа (WT), мышей TIGITxCD112R KO (с двойным KO), мышей CD112R KO или мышей TIGIT KO, которых обрабатывали изотипическим контролем или антителом к PD1. Пронумерованные группы соответствуют (1) мышам WT, обработанным антителом изотипического контроля, (2) мышам TIGITxCD112R KO, обработанным антителом изотипического контроля, (3) мышам WT, обработанным антителом к PD-1, (4) мышам CD112R KO, обработанным антителом к PD-1, (5) мышам TIGIT KO, обработанным антителом к PD-1, и (6) мышам TIGITxCD112R KO, обработанным антителом к PD-1. На фигуре 24В представлен график объема опухоли в сингенной модели опухоли B16F10, где номера групп соответствуют (1) мышам WT, обработанным антителом изотипического контроля, (2) мышам WT, обработанным антителом к PD-1, (3) мышам TIGITxCD112R KO (dKO), обработанным антителом изотипического контроля, и (4) мышам TIGITxCD112R KO (dKO), обработанным антителом к PD-1. На фигуре 24С представлен график объема опухоли, измеренного с течением времени в ксенотрансплантатной модели, обработанной (1) антителом изотипического контроля, (2) антителом к PD-1, (3) комбинированным составом, содержащим mAb к TIGIT и mAb к CD112R, и (4) комбинированным составом, содержащим mAb к TIGIT, mAb к CD112R и mAb к PD-1.

[0055] На каждой из фигур 25А-25D представлен график % высокомолекулярных (HMW) разновидностей в зависимости от времени (недели), определенных в составе, содержащем (1) mAb к CD112R (CD112R), (2) mAb к TIGIT (TIGIT-10), (3) другое mAb к TIGIT (TIGIT-12), (4) как mAb к CD112R, так и mAb к TIGIT-10 и (5) как mAb к CD112R, так и mAb к TIGIT-12, после хранения при -30°C (фигура 25А), 4°C (фигура 25В), 25°C (фигура 25С) и 40°C (фигура 25D), как измерено посредством SEC.

[0056] На фигуре 26 представлена таблица, в которой перечислены % пиков LMW+HMW в составах, содержащих 70 мг/мл или 140 мг/мл mAb к CD112R, TIGIT-10 или TIGIT-12, или в составе, содержащем как антитело к CD112R, так и антитело к TIGIT-10, в соотношении 1:1, или содержащем как антитело к CD112R, так и антитело к TIGIT-12, в соотношении 1:1.

[0057] На фигуре 27 представлен график вязкости (сП) составов, содержащих 70 мг/мл или 140 мг/мл mAb к CD112R, TIGIT-10 или TIGIT-12, или состава, содержащего как антитело к CD112R, так и антитело к TIGIT-10, в соотношении 1:1, или содержащего как антитело к CD112R, так и антитело к TIGIT-12, в соотношении 1:1.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0058] TIGIT и CD112R (также известный как PVRIG) принадлежат к семейству рецепторов, которые содержат домен(домены) иммуноглобулина (Ig) во внеклеточной области. Эти рецепторы взаимодействуют с лигандами, которые также содержат домен(домены) Ig. Хотя имеются доказательства того, что каждый рецептор способен взаимодействовать с несколькими лигандами в семействе, TIGIT-CD155 и CD112R-CD112

представляют собой первичные пары рецептор-лиганд на основании порядка ранжирования, определенного посредством измерений аффинности. Другой представитель семейства, CD226, способен взаимодействовать как с CD112, так и с CD155, при этом оба взаимодействуют с более слабой аффинностью, чем в случае TIGIT-CD155 и CD112R-CD112. Активация CD226 усиливает активность T/NK-клеток, особенно в контексте ответа T/NK-клеток на опухолевые клетки. Считается, что этот "костимулирующий" сигнал ингибируется, когда TIGIT и CD112R коэкспрессируются при высоких уровнях, поскольку 1) как TIGIT, так и CD112R связываются с лигандами с более высокими значениями аффинности, чем CD226, и эффективно ограничивают доступность лиганда, и 2) внутриклеточные домены TIGIT и CD112R содержат ITIM или ITIM-подобные домены, которые, как считается, генерируют ингибирующие сигналы, хотя природа такого сигнала не была подробно охарактеризована в Т-клетках.

[0059] Транскрипты CD155 и CD112, первичные лиганды для TIGIT и CD112R, присутствуют в широком диапазоне тканей и типов клеток. Это контрастирует с PD-L1, экспрессия которого более ограничена, при этом преимущественная экспрессия имеет место в антигенпредставляющих клетках и опухолевых клетках. Было показано, что эти лиганды индуцируются различными типами раздражителей: в то время как PD-L1 активируется при воздействии $IFN\gamma$, CD155 и CD112 не регулируются воздействием этого цитокина и вместо этого активируются в ответ на повреждение ДНК, вирусную инфекцию и активные формы кислорода (ROS). Следовательно, ответ с индукцией лиганда дополнительно дифференцирует пути с участием TIGIT и CD112R от путей с участием PD-1.

[0060] Настоящее изобретение предусматривает антигенсвязывающие белки, например, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с TIGIT, например, TIGIT-связывающие белки, также обозначенные в данном документе как антигенсвязывающие белки, связывающие TIGIT. В предпочтительных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, представляет собой антитело, которое специфически связывает TIGIT (например, антитело к TIGIT, антитело к α -TIGIT).

[0061] Настоящее изобретение дополнительно предусматривает антигенсвязывающие белки, которые связываются с CD112R, например, CD112R-связывающие белки, также обозначенные в данном документе как антигенсвязывающие белки, связывающие CD112R. В предпочтительных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, представляет собой антитело, которое специфически связывает CD112R ((например, антитело к CD112R, антитело к α -CD112R)).

[0062] *Характеристики связывания*

[0063] В иллюстративных вариантах осуществления сила связывания раскрытого в настоящем изобретении антигенсвязывающего белка, связывающего TIGIT, при связывании с TIGIT описана в терминах его аффинности. В иллюстративных аспектах

сила связывания раскрытого в настоящем изобретении антигенсвязывающего белка, связывающего TIGIT, с TIGIT описана в терминах K_D . Сходным образом, сила связывания раскрытого в настоящем изобретении антигенсвязывающего белка, связывающего CD112R, при связывании с CD112R описана в терминах его аффинности, и в иллюстративных аспектах сила связывания раскрытого в настоящем изобретении антигенсвязывающего белка, связывающего CD112R, с CD112R описана в терминах K_D . K_D представляет собой равновесную константу диссоциации, соотношение k_{off}/k_{on} , между антигенсвязывающим белком и его мишенью или антигеном. K_D обратно пропорциональна аффинности. Значение K_D относится к концентрации антигенсвязывающего белка, и, таким образом, чем ниже значение K_D , тем выше аффинность антигенсвязывающего белка. В иллюстративных аспектах K_D антигенсвязывающих белков, связывающих TIGIT, и антигенсвязывающих белков, связывающих CD112R, предусмотренных в данном документе, является микромолярной, наномолярной, пикомолярной или фемтомолярной. В иллюстративных аспектах K_D антигенсвязывающих белков, связывающих TIGIT, или антигенсвязывающих белков, связывающих CD112R, предусмотренных в данном документе, находится в диапазоне от приблизительно 10^{-4} до 10^{-6} М, или от 10^{-7} до 10^{-9} М, или от 10^{-10} до 10^{-12} М, или от 10^{-13} до 10^{-15} М. Необязательно K_D антигенсвязывающих белков, связывающих TIGIT, или антигенсвязывающих белков, связывающих CD112R, предусмотренных в данном документе, находится в диапазоне от приблизительно 10^{-12} до 10^{-8} М, необязательно от 10^{-11} до 10^{-10} М.

[0064] В различных аспектах антигенсвязывающий белок, например, антитело, связывается с TIGIT человека. Аминокислотная последовательность TIGIT человека представлена в данном документе под SEQ ID NO: 1. В частности, аминокислоты 1-21 из SEQ ID NO: 1 представляют собой сигнальный пептид, и аминокислоты 22-244 из SEQ ID NO: 1 представляют собой зрелую аминокислотную последовательность TIGIT человека. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок связывается с TIGIT человека с K_D , которая составляет приблизительно 50 нМ или меньше (например, приблизительно 40 нМ или меньше, приблизительно 30 нМ или меньше, приблизительно 20 нМ или меньше или приблизительно 10 нМ или меньше). В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок связывается с TIGIT человека с K_D , которая составляет менее или приблизительно 5 нМ, менее или приблизительно 4 нМ, менее или приблизительно 3 нМ, менее или приблизительно 2 нМ или менее или приблизительно 1 нМ. В различных аспектах K_D антигенсвязывающего белка при связывании с TIGIT человека составляет менее 1 нМ, например, менее 0,75 нМ, менее 0,5 нМ или менее 0,25 нМ. Необязательно K_D антигенсвязывающего белка при связывании с TIGIT человека составляет более или приблизительно 0,001 нМ или более или приблизительно 0,01 нМ и менее 0,5 нМ. В различных аспектах K_D антигенсвязывающего белка при связывании с TIGIT человека составляет от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 0,5 нМ, от приблизительно 0,02 нМ до приблизительно 0,5 нМ, от приблизительно 0,03 нМ до приблизительно 0,5 нМ, от

приблизительно 0,04 нМ до приблизительно 0,5 нМ, от приблизительно 0,05 нМ до приблизительно 0,5 нМ, от приблизительно 0,06 нМ до приблизительно 0,5 нМ, от приблизительно 0,07 нМ до приблизительно 0,5 нМ, от приблизительно 0,08 нМ до приблизительно 0,5 нМ, от приблизительно 0,09 нМ до приблизительно 0,5 нМ, от приблизительно 0,1 нМ до приблизительно 0,5 нМ, от приблизительно 0,2 нМ до приблизительно 0,5 нМ, от приблизительно 0,3 нМ до приблизительно 0,5 нМ, от приблизительно 0,4 нМ до приблизительно 0,5 нМ, от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 0,4 нМ, от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 0,3 нМ, от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 0,2 нМ, от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 0,1 нМ, от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 0,09 нМ, от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 0,08 нМ, от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 0,07 нМ, от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 0,06 нМ, от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 0,05 нМ, от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 0,04 нМ, от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 0,03 нМ или от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 0,02 нМ. В различных аспектах антигенсвязывающий белок также связывается с TIGIT яванского макака (макака-крабоеда). Аминокислотная последовательность TIGIT макака-крабоеда представлена в данном документе под SEQ ID NO: 2024. В частности, аминокислоты 1-21 из SEQ ID NO: 2024 представляют собой сигнальный пептид, и аминокислоты 22-245 из SEQ ID NO: 2024 представляют собой зрелый белок TIGIT макака-крабоеда. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок связывается с TIGIT яванского макака с K_D , которая составляет от приблизительно 1 нМ до приблизительно 25 нМ, например, от приблизительно 5 нМ до приблизительно 20 нМ или от приблизительно 5 нМ до приблизительно 15 нМ. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок связывается с TIGIT яванского макака (макака-крабоеда) с K_D от приблизительно 8 нМ до приблизительно 14 нМ. В различных аспектах антигенсвязывающий белок с высокой аффинностью связывается как с TIGIT человека, так и с TIGIT макака-крабоеда. Необязательно K_D антигенсвязывающего белка при связывании с TIGIT человека составляет от приблизительно 0,01 нМ до менее 0,5 нМ, и K_D антигенсвязывающего белка, который связывает TIGIT макака-крабоеда, составляет от приблизительно 8 нМ до приблизительно 14 нМ. В иллюстративных примерах K_D антигенсвязывающего белка при связывании с TIGIT человека находится в пределах приблизительно 100-кратного, приблизительно 50-кратного, приблизительно 25-кратного, приблизительно 10-кратного, приблизительно 5-кратного или приблизительно 2-кратного или меньшего значения K_D антигенсвязывающего белка при связывании с TIGIT макака-крабоеда. В различных аспектах значение EC50 антигенсвязывающего белка, связывающего TIGIT, при связывании Т-клеток человека, экспрессирующих TIGIT человека, находится в пределах приблизительно 100-кратного, приблизительно 50-кратного, приблизительно 25-кратного, приблизительно 10-кратного, приблизительно 5-кратного или приблизительно 2-кратного или меньшего значения EC50 антигенсвязывающего белка, связывающего TIGIT, при

связывании с РВМС макака-крабоеда, экспрессирующими TIGIT макака-крабоеда.

[0065] В различных примерах антигенсвязывающий белок, например, антитело, связывается с CD112R человека. Аминокислотная последовательность CD112R человека представлена в данном документе под SEQ ID NO: 3. В частности, аминокислота 53 из SEQ ID NO: 3 представляет собой первую аминокислоту внеклеточного домена. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок с высокой аффинностью связывается как с CD112R человека, так и с CD112R макака-крабоеда. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок связывается с CD112R человека с K_D , которая составляет приблизительно 50 нМ или меньше (например, приблизительно 40 нМ или меньше, приблизительно 30 нМ или меньше, приблизительно 20 нМ или меньше или приблизительно 10 нМ или меньше). В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок связывается с CD112R человека с K_D , которая составляет менее или приблизительно 5 нМ, менее или приблизительно 4 нМ, менее или приблизительно 3 нМ, менее или приблизительно 2 нМ или менее или приблизительно 1 нМ. В различных аспектах K_D антигенсвязывающего белка при связывании с CD112R человека составляет менее 1 нМ, например, менее 0,75 нМ, менее 0,5 нМ или менее 0,25 нМ. Необязательно K_D антигенсвязывающего белка при связывании с CD112R человека составляет более или приблизительно 0,001 нМ или более или приблизительно 0,01 нМ и менее 3 нМ. В различных аспектах K_D антигенсвязывающего белка при связывании с CD112R человека составляет от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 5 нМ, от приблизительно 0,05 нМ до приблизительно 5 нМ, от приблизительно 0,10 нМ до приблизительно 5 нМ, от приблизительно 0,5 нМ до приблизительно 5 нМ, от приблизительно 1 нМ до приблизительно 5 нМ, от приблизительно 2 нМ до приблизительно 5 нМ, от приблизительно 3 нМ до приблизительно 5 нМ, от приблизительно 4 нМ до приблизительно 5 нМ, от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 4 нМ, от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 3 нМ, от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 2 нМ, от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 1 нМ, от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 0,5 нМ, от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 0,1 нМ или от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 0,05 нМ. В различных аспектах антигенсвязывающий белок связывается с CD112R макака-крабоеда. Аминокислотная последовательность CD112R макака-крабоеда представлена в данном документе под SEQ ID NO: 2022, при этом аминокислота 53 представляет собой первую аминокислоту внеклеточного домена. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок связывается с CD112R яванского макака (макака-крабоеда) с K_D , которая составляет от приблизительно 1 нМ до приблизительно 25 нМ, например, от приблизительно 5 нМ до приблизительно 20 нМ или от приблизительно 5 нМ до приблизительно 15 нМ. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок связывается с CD112R макака-крабоеда с K_D от приблизительно 0,05 нМ до приблизительно 0,15 нМ. Необязательно K_D антигенсвязывающего белка при связывании с CD112R человека составляет от приблизительно 0,01 нМ до менее 5 нМ, и K_D антигенсвязывающего белка, который

связывает CD112R макака-крабоеда, составляет от приблизительно 0,05 нМ до приблизительно 0,15 нМ.

[0066] В иллюстративных примерах K_D антигенсвязывающего белка при связывании с CD112R человека находится в пределах приблизительно 100-кратного, приблизительно 50-кратного, приблизительно 25-кратного, приблизительно 10-кратного, приблизительно 5-кратного или приблизительно 2-кратного или меньшего значения K_D антигенсвязывающего белка при связывании с CD112R макака-крабоеда. В различных аспектах значение EC_{50} антигенсвязывающего белка, связывающего CD112R, при связывании Т-клеток человека, экспрессирующих CD112R человека, находится в пределах приблизительно 100-кратного, приблизительно 50-кратного, приблизительно 25-кратного, приблизительно 10-кратного, приблизительно 5-кратного или приблизительно 2-кратного или меньшего значения EC_{50} антигенсвязывающего белка, связывающего CD112R, при связывании с РВМС макака-крабоеда, экспрессирующими CD112R макака-крабоеда.

[0067] В иллюстративных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, например, антитело, демонстрирует аффинность связывания со своей мишенью (TIGIT или CD112R), которая повышена относительно аффинности связывания при нативном взаимодействии между TIGIT и CD155, TIGIT и CD112 или CD112R и CD112. Повышение аффинности связывания может представлять собой повышение на по меньшей мере или приблизительно 5%, повышение на по меньшей мере или приблизительно 10%, повышение на по меньшей мере или приблизительно 15%, повышение на по меньшей мере или приблизительно 20%, повышение на по меньшей мере или приблизительно 25%, повышение на по меньшей мере или приблизительно 30%, повышение на по меньшей мере или приблизительно 35%, повышение на по меньшей мере или приблизительно 40%, повышение на по меньшей мере или приблизительно 45%, повышение на по меньшей мере или приблизительно 50%, повышение на по меньшей мере или приблизительно 55%, повышение на по меньшей мере или приблизительно 60%, повышение на по меньшей мере или приблизительно 65%, повышение на по меньшей мере или приблизительно 70%, повышение на по меньшей мере или приблизительно 75%, повышение на по меньшей мере или приблизительно 80%, повышение на по меньшей мере или приблизительно 85%, повышение на по меньшей мере или приблизительно 90%, повышение на по меньшей мере или приблизительно 95% относительно аффинности связывания TIGIT человека со своим лигандом (CD155) или относительно аффинности связывания CD112R человека со своим лигандом (CD112). В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок демонстрирует повышение, которое представляет собой приблизительно 2-, 5-, 10-, 15-, 20-, 25-, 30-, 35-, 40-, 45-, 50-, 55-, 60-, 65-, 70-, 75-, 80-, 85-, 90-, 95-, 100-, 105-, 110-, 115-, 120-, 125-, 130-, 135-, 140-, 145-, 150-, 175-, 200-, 225-, 250-, 275-, 300-, 325-, 350-, 375-, 400-, 425-, 450-, 475-, 500-, 525-, 550-, 575-, 600-, 625-, 650-, 675-, 700-, 725-, 750-, 775-, 800-, 825-, 850-, 875-, 900-, 925-, 950-, 975-кратное, 1000-кратное или большее повышение аффинности связывания со своей мишенью (TIGIT или CD112R) относительно аффинности связывания TIGIT человека с CD155 человека или аффинности связывания

CD112R человека с CD112 человека.

[0068] *Конкурентные анализы*

[0069] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, например, антитело, ингибирует связывающее взаимодействие между TIGIT человека и эталонным антителом, при этом известно, что эталонное антитело связывается с TIGIT, но не является антигенсвязывающим белком по настоящему изобретению. В различных примерах TIGIT-связывающие белки по настоящему изобретению конкурируют с эталонным антителом за связывание с TIGIT человека и за счет этого снижают количество TIGIT человека, связанного с эталонным антителом, как определено посредством конкурентного анализа связывания *in vitro*. В различных аспектах антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению ингибируют связывающее взаимодействие между TIGIT человека и эталонным антителом, и это ингибирование характеризуется значением IC_{50} . В различных аспектах антигенсвязывающие белки демонстрируют значение IC_{50} , составляющее менее приблизительно 250 нМ, при ингибировании связывающего взаимодействия между TIGIT человека и эталонным антителом. В различных аспектах антигенсвязывающие белки демонстрируют значение IC_{50} , составляющее менее приблизительно 200 нМ, менее приблизительно 150 нМ, менее приблизительно 100 нМ, менее приблизительно 90 нМ, менее приблизительно 80 нМ, менее приблизительно 70 нМ, менее приблизительно 60 нМ, менее приблизительно 50 нМ, менее приблизительно 40 нМ, менее приблизительно 30 нМ, менее приблизительно 20 нМ или менее приблизительно 10 нМ. В различных аспектах антигенсвязывающие белки демонстрируют значение IC_{50} , составляющее менее приблизительно 9 нМ, менее приблизительно 8 нМ, менее приблизительно 7 нМ, менее приблизительно 6 нМ, менее приблизительно 5 нМ, менее приблизительно 4 нМ, менее приблизительно 3 нМ, менее приблизительно 2 нМ, менее приблизительно 1 нМ, менее приблизительно 0,5 нМ или менее 0,1 нМ. В различных примерах антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению конкурируют с эталонным антителом за связывание с TIGIT человека и за счет этого снижают количество TIGIT человека, связанного с эталонным антителом, как определено посредством анализа на основе FACS, в котором флуоресценцию конъюгированного с флуорофором вторичного антитела, которое связывается с Fc эталонного антитела, измеряют в отсутствие или в присутствии определенного количества антигенсвязывающего белка по настоящему изобретению. В различных аспектах анализ на основе FACS проводят с эталонным антителом, конъюгированным с флуорофором вторичным антителом и клетками, которые экспрессируют TIGIT. В различных аспектах клетки являются генетически сконструированными для сверхэкспрессии TIGIT. В некоторых аспектах клетки представляют собой клетки HEK293T, трансдуцированные вирусным вектором для экспрессии TIGIT. В альтернативных аспектах клетки эндогенно экспрессируют TIGIT. Перед проведением анализа на основе FACS в некоторых аспектах клетки, которые эндогенно экспрессируют TIGIT, предварительно определяются как клетки с низкой экспрессией TIGIT или клетки с высокой экспрессией TIGIT.

[0070] В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок, например, антитело, ингибирует связывающее взаимодействие между TIGIT человека и его нативным лигандом, например, CD155, CD112. В различных примерах антигенсвязывающий белок, например, антитело, ингибирует связывающее взаимодействие между TIGIT человека и CD155, как определено посредством конкурентного анализа связывания рецептор-лиганд на основе FACS, такого как анализ, описанный в данном документе в примере 5. В различных аспектах более 80% (например, более 85%, более 90%) связывающих взаимодействий между TIGIT человека и CD155 ингибируются в присутствии раскрытого в настоящем изобретении антигенсвязывающего белка, например, антитела. Необязательно более 95% (например, более 96%, более 97%, более 98%, более 99% или около 100%) связывающих взаимодействий между TIGIT человека и CD155 ингибируются в присутствии раскрытого в настоящем изобретении антигенсвязывающего белка, например, антитела, как определено посредством конкурентного анализа связывания рецептор-лиганд на основе FACS, такого как анализ, описанный в данном документе в примере 5.

[0071] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, например, антитело, ингибирует связывающее взаимодействие между CD112R человека и эталонным антителом, при этом известно, что эталонное антитело связывается с CD112R, но не является антигенсвязывающим белком по настоящему изобретению. В различных примерах CD112R-связывающие белки по настоящему изобретению конкурируют с эталонным антителом за связывание с CD112R человека и за счет этого снижают количество CD112R человека, связанного с эталонным антителом, как определено посредством конкурентного анализа связывания *in vitro*. В различных аспектах антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению ингибируют связывающее взаимодействие между CD112R человека и эталонным антителом, и это ингибирование характеризуется значением IC_{50} . В различных аспектах антигенсвязывающие белки демонстрируют значение IC_{50} , составляющее менее 250 нМ, при ингибировании связывающего взаимодействия между CD112R человека и эталонным антителом. В различных аспектах антигенсвязывающие белки демонстрируют значение IC_{50} , составляющее менее приблизительно 200 нМ, менее приблизительно 150 нМ, менее приблизительно 100 нМ, менее приблизительно 90 нМ, менее приблизительно 80 нМ, менее приблизительно 70 нМ, менее приблизительно 60 нМ, менее приблизительно 50 нМ, менее приблизительно 40 нМ, менее приблизительно 30 нМ, менее приблизительно 20 нМ или менее приблизительно 10 нМ. В различных аспектах антигенсвязывающие белки демонстрируют значение IC_{50} , составляющее менее приблизительно 9 нМ, менее приблизительно 8 нМ, менее приблизительно 7 нМ, менее приблизительно 6 нМ, менее приблизительно 5 нМ, менее приблизительно 4 нМ, менее приблизительно 3 нМ, менее приблизительно 2 нМ, менее приблизительно 1 нМ, менее приблизительно 0,5 нМ или менее 0,1 нМ. Необязательно антигенсвязывающие белки демонстрируют значение IC_{50} от приблизительно 0,05 нМ до приблизительно 0,5 нМ (например, приблизительно 0,06 нМ,

приблизительно 0,07 нМ, приблизительно 0,08 нМ, приблизительно 0,09 нМ, приблизительно 0,1 нМ, приблизительно 0,2 нМ, приблизительно 0,3 нМ, приблизительно 0,4 нМ, приблизительно 0,5 нМ). В различных примерах антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению конкурируют с эталонным антителом за связывание с CD112R человека и за счет этого снижают количество CD112R человека, связанного с эталонным антителом, как определено посредством анализа на основе FACS, в котором флуоресценцию конъюгированного с флуорофором вторичного антитела, которое связывается с Fc эталонного антитела, измеряют в отсутствие или в присутствии определенного количества антигенсвязывающего белка по настоящему изобретению. В различных аспектах анализ на основе FACS проводят с эталонным антителом, конъюгированным с флуорофором вторичным антителом и клетками, которые экспрессируют CD112R. В различных аспектах клетки являются генетически сконструированными для сверхэкспрессии CD112R. В некоторых аспектах клетки представляют собой клетки HEK293T, трансдуцированные вирусным вектором для экспрессии CD112R. В альтернативных аспектах клетки эндогенно экспрессируют CD112R. Перед проведением анализа на основе FACS в некоторых аспектах клетки, которые эндогенно экспрессируют CD112R, предварительно определяются как клетки с низкой экспрессией CD112R или клетки с высокой экспрессией CD112R.

[0072] В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок, например, антитело, ингибирует связывающее взаимодействие между CD112R человека и его нативным лигандом, например, CD112. В различных примерах антигенсвязывающий белок, например, антитело, ингибирует связывающее взаимодействие между CD112R человека и CD112, как определено посредством конкурентного анализа связывания рецептор-лиганд на основе FACS, такого как анализ, описанный в данном документе в примере 3. В различных аспектах более 90% связывающих взаимодействий между CD112R человека и CD112 ингибируются в присутствии раскрытого в настоящем изобретении антигенсвязывающего белка, например, антитела. Необязательно более 95% (например, более 96%, более 97%, более 98%, более 99% или около 100%) связывающих взаимодействий между CD112R человека и CD112 ингибируются в присутствии раскрытого в настоящем изобретении антигенсвязывающего белка, например, антитела, как определено посредством конкурентного анализа связывания рецептор-лиганд на основе FACS, такого как анализ, описанный в данном документе в примере 3.

[0073] Другие анализы связывания, например, анализы конкурентного связывания или конкурентные анализы, в которых тестируют способность антитела конкурировать с другим антигенсвязывающим белком за связывание с антигеном или с его эпитопом, известны из уровня техники. См., например, Trikha et al., *Int J Cancer* 110: 326-335 (2004); Tam et al., *Circulation* 98(11): 1085-1091 (1998); публикацию заявки на патент США № US20140178905, Chand et al., *Biologicals* 46: 168-171 (2017); Liu et al., *Anal Biochem* 525: 89-91 (2017); Goolia et al., *J Vet Diagn Invest* 29(2): 250-253 (2017); Hunter and Cochran, *Methods Enzymol* 250: 21-44 (2016); Cox et al., *Immunoassay Methods*, *Immunoassay*

Methods. 2012 May 1 [Updated 2019 Jul 8]. B Sittampalam GS, Grossman A, Brimacombe K, et al., editors. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-. Доступно по адресу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92434/>; Clarke, William, "Immunoassays for Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology", Handbook of Analytical Separations, Volume 5, pages 95-112 (2004), и Goolia et al., J Vet Diagn Invest 29(2): 250-253 (2017). Также из уровня техники известны другие способы сравнения двух антител, и они включают, например, поверхностный плазмонный резонанс (SPR). SPR можно применять для определения констант связывания антитела и второго антитела, и две константы связывания можно сравнивать.

[0074] *Ингибирование и антагонизм*

[0075] В различных примерах антигенсвязывающий белок, например, антитело, связывается со своей мишенью или антигеном и ингибирует связывающее взаимодействие между мишенью или антигеном и своим нативным лигандом или партнером по связыванию. В иллюстративных аспектах раскрытый в настоящем изобретении TIGIT-связывающий белок связывается с TIGIT и за счет этого ингибирует связывающее взаимодействие между TIGIT и CD155. В качестве альтернативы или дополнительно, в иллюстративных примерах раскрытый в настоящем изобретении TIGIT-связывающий белок ингибирует связывающее взаимодействие между TIGIT и другими лигандами (например, CD112). В иллюстративных аспектах раскрытый в настоящем изобретении CD112R-связывающий белок связывается с CD112R и за счет этого ингибирует связывающее взаимодействие между CD112R и CD112. В качестве альтернативы или дополнительно, в иллюстративных примерах раскрытый в настоящем изобретении CD112R-связывающий белок ингибирует связывающее взаимодействие между CD112R и другими лигандами (например, CD96, CD226, TIGIT). В различных аспектах антигенсвязывающий белок, например, антитело, является антагонистом, который ингибирует биологическую активность мишени или антигена. В различных аспектах CD112R-связывающий белок связывается с CD112R и ингибирует путь(пути) передачи сигнала, активируемый(активируемые) при связывании CD112 с CD112R. В различных аспектах TIGIT-связывающий белок связывается с TIGIT и ингибирует путь(пути) передачи сигнала, активируемый(активируемые) при связывании CD155 с TIGIT. Дополнительный(дополнительные) путь(пути) передачи сигнала может(могут) быть ингибирован(ингибированы) при связывании TIGIT-связывающего белка с TIGIT или при связывании CD112R-связывающего белка с CD112R.

[0076] Снижение или ингибирование, обеспечиваемое антигенсвязывающим белком, например, антителом, может не представлять собой 100% или полное ингибирование, или устранение, или снижение. Напротив, существуют варьирующиеся степени снижения или ингибирования, которые специалист в данной области распознает как обладающие потенциальной пользой или терапевтическим эффектом. В этом отношении антигенсвязывающий белок способен ингибировать белок(белки) TIGIT и/или

CD112R до любого количества или уровня. В иллюстративных вариантах осуществления снижение или ингибирование, обеспечиваемое антигенсвязывающим белком, представляет собой по меньшей мере или приблизительно 10% снижение или ингибирование (например, по меньшей мере или приблизительно 20% снижение или ингибирование, по меньшей мере или приблизительно 30% снижение или ингибирование, по меньшей мере или приблизительно 40% снижение или ингибирование, по меньшей мере или приблизительно 50% снижение или ингибирование, по меньшей мере или приблизительно 60% снижение или ингибирование, по меньшей мере или приблизительно 70% снижение или ингибирование, по меньшей мере или приблизительно 80% снижение или ингибирование, по меньшей мере или приблизительно 90% снижение или ингибирование, по меньшей мере или приблизительно 95% снижение или ингибирование, по меньшей мере или приблизительно 98% снижение или ингибирование).

[0077] В иллюстративных примерах антигенсвязывающий белок по настоящему изобретению ингибирует связывание CD112 с CD112R или TIGIT с CD155. В иллюстративных аспектах ингибирование может быть охарактеризовано в терминах половины максимальной ингибирующей концентрации (**IC₅₀**), которая является показателем эффективности антигенсвязывающего белка в ингибировании конкретной биологической или биохимической функции.

[0078] Подходящие способы измерения ингибирующей или антагонистической активности антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению известны из уровня техники. В иллюстративных примерах антагонистическая или ингибирующая активность антигенсвязывающих белков может быть проанализирована посредством измерения уровня активации TCR, учитывая, что одновременное связывание CD112R с CD112 и/или TIGIT с CD155 и активация Т-клеточного рецептора (TCR) Т-клетки приводит к образованию ингибирующего сигнала, который инактивирует или отключает TCR-опосредованные ответы, и, следовательно, блокирование взаимодействия между CD112R и CD112 и/или TIGIT с CD155 при лигировании TCR приводит к TCR-опосредованным видам активности, включая одно или несколько из фосфорилирования субъединиц TCR, рекрутинга Zap70 к TCR, фосфорилирования LAT и/или SLP-76, мобилизации кальция или высвобождения кальция из эндоплазматического ретикулума (ER), активации PLC-гамма, продуцирования диацилглицерина (DAG) и инозитолтрифосфата (IP3), активации протеинкиназы C, передачи сигнала MARPK/Erk, активации NF-κB, активации NFAT, активации промотора IL-2, продуцирования IL-2, продуцирования IFN-гамма, пролиферации Т-клеток и т. п. См., например, Smith-Garvin et al., *Annu Rev Immunol* 27: 591-619 (2009). Таким образом, в различных примерах ингибирующая или антагонистическая активность антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению может быть проанализирована, например, посредством измерения продуцирования IL-2, продуцирования IFN-гамма и/или активации NF-κB и/или NFAT. В различных аспектах используют репортерный анализ гена люциферазы с Т-клетками Jurkat, где при активации TCR и в присутствии TIGIT-связывающих белков и/или CD112R-связывающих белков

измеряют активность люциферазы. Ожидается, что в присутствии TIGIT-связывающих белков и/или CD112R-связывающих белков активность люциферазы будет выше, чем активность люциферазы, наблюдаемая в отсутствие TIGIT-связывающих белков и/или CD112R-связывающих белков. RGA с клетками Jurkat описаны в данном документе в разделе "Примеры" (см., например, пример 3 и пример 5). В различных аспектах антагонистическая активность TIGIT-связывающих белков и/или CD112R-связывающих белков может быть измерена посредством анализа связывания рецептор-лиганд или RGA с клетками Jurkat. В различных аспектах антагонистическая активность или ингибирующая активность антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению может быть измерена посредством RGA с клетками Jurkat, и активность выражается в виде значения EC_{50} . В различных примерах значение EC_{50} антигенсвязывающего белка, связывающего CD112R, или антигенсвязывающего белка, связывающего TIGIT, находится в пределах от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 9 нМ, от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 8 нМ, от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 7 нМ, от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 6 нМ, от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 5 нМ, от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 4 нМ, от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 3 нМ, от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 2 нМ, от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 1 нМ, от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 0,5 нМ, от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 0,1 нМ, от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 0,05 нМ, от приблизительно 0,05 нМ до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 0,1 нМ до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 0,5 нМ до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 1 нМ до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 2 нМ до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 3 нМ до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 4 нМ до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 5 нМ до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 6 нМ до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 7 нМ до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 8 нМ до приблизительно 10 нМ или от приблизительно 9 нМ до приблизительно 10 нМ. Необязательно антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, демонстрирует значение EC_{50} в RGA с клетками Jurkat, описанное выше и/или описанное на фигурах 7В или в таблицах 2-5. Необязательно антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, демонстрирует значение EC_{50} в RGA с клетками Jurkat, описанное выше и/или описанное в таблицах 13-15.

[0079] В иллюстративных аспектах значение IC_{50} антигенсвязывающего белка, связывающего CD112R, составляет менее приблизительно 10 нМ, необязательно менее 5 нМ. В иллюстративных аспектах значение IC_{50} антигенсвязывающего белка, связывающего CD112R, составляет менее 2 нМ или менее 1 нМ. В иллюстративных аспектах значение IC_{50} антигенсвязывающего белка, связывающего CD112R, составляет от приблизительно 0,5 нМ до приблизительно 2 нМ. В различных примерах значение IC_{50}

антигенсвязывающего белка, связывающего CD112R, находится в пределах от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 9 нМ, от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 8 нМ, от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 7 нМ, от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 6 нМ, от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 5 нМ, от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 4 нМ, от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 3 нМ, от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 2 нМ, от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 1 нМ, от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 0,5 нМ, от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 0,1 нМ, от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 0,05 нМ, от приблизительно 0,05 нМ до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 0,1 нМ до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 0,5 нМ до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 1 нМ до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 2 нМ до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 3 нМ до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 4 нМ до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 5 нМ до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 6 нМ до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 7 нМ до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 8 нМ до приблизительно 10 нМ или от приблизительно 9 нМ до приблизительно 10 нМ. В различных аспектах значение IC_{50} антигенсвязывающего белка, связывающего CD112R, представляет собой показатель эффективности антигенсвязывающего белка, связывающего CD112R, в ингибировании связывающего взаимодействия между CD112R и CD112, как определяется посредством анализа связывания рецептор-лиганд. См., например, пример 3.

[0080] В иллюстративных аспектах значение IC_{50} антигенсвязывающего белка, связывающего TIGIT, составляет менее приблизительно 10 нМ, необязательно менее 5 нМ. В иллюстративных аспектах значение IC_{50} антигенсвязывающего белка, связывающего TIGIT, составляет менее 2 нМ или менее 1 нМ. В иллюстративных аспектах значение IC_{50} антигенсвязывающего белка, связывающего TIGIT, составляет от приблизительно 0,5 нМ до приблизительно 2 нМ. В различных примерах значение IC_{50} антигенсвязывающего белка, связывающего TIGIT, находится в пределах от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 9 нМ, от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 8 нМ, от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 7 нМ, от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 6 нМ, от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 5 нМ, от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 4 нМ, от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 3 нМ, от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 2 нМ, от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 1 нМ, от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 0,5 нМ, от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 0,1 нМ, от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 0,05 нМ, от приблизительно 0,05 нМ до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 0,1 нМ до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 0,5 нМ до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 1 нМ до

приблизительно 10 нМ, от приблизительно 2 нМ до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 3 нМ до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 4 нМ до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 5 нМ до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 6 нМ до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 7 нМ до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 8 нМ до приблизительно 10 нМ или от приблизительно 9 нМ до приблизительно 10 нМ. В различных аспектах значение IC_{50} антигенсвязывающего белка, связывающего TIGIT, представляет собой показатель эффективности антигенсвязывающего белка, связывающего TIGIT, в ингибировании связывающего взаимодействия между TIGIT и CD155 или CD112, как определяется посредством анализа связывания рецептор-лиганд. См., например, пример 5.

[0081] *Типы антигенсвязывающих белков*

[0082] Антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению могут принимать любую из многих форм антигенсвязывающих белков, известных из уровня техники. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок представляет собой антитело или иммуноглобулин, или его антигенсвязывающий фрагмент антитела, или белковый продукт на основе антитела.

[0083] В совокупности антитела образуют семейство белков плазмы крови, известных как иммуноглобулины, и содержат домены иммуноглобулинов. (Janeway et al., Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 4th ed., Elsevier Science Ltd./Garland Publishing, 1999.) Используемый в данном документе термин "антитело" относится к белку в традиционном формате иммуноглобулина, содержащему тяжелые и легкие цепи и содержащему переменные и константные области. Например, антитело может представлять собой IgG, который имеет "Y-образную" структуру из двух идентичных пар полипептидных цепей, при этом каждая пара имеет одну "легкую" (как правило, имеющую молекулярную массу, составляющую приблизительно 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (как правило, имеющую молекулярную массу, составляющую приблизительно 50-70 кДа). Антитело имеет переменную область и константную область. В форматах IgG переменная область обычно имеет приблизительно 100-110 или больше аминокислот, содержит три области, определяющие комплементарность (CDR), в первую очередь отвечает за распознавание антигена и существенно отличается среди других антител, которые связываются с различными антигенами. Константная область позволяет антителу привлекать клетки и молекулы иммунной системы. Переменная область состоит из N-концевых областей каждой легкой цепи и тяжелой цепи, тогда как константная область состоит из C-концевых частей каждой из тяжелых и легких цепей. (Janeway et al., "Structure of the Antibody Molecule and the Immunoglobulin Genes", Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 4th ed. Elsevier Science Ltd./Garland Publishing, (1999)).

[0084] Общая структура и свойства CDR антител были описаны в уровне техники. Вкратце, в остоле антитела CDR заключены в пределах каркасной области в переменной области тяжелой и легкой цепей, где они составляют области, главным образом

отвечающие за связывание и распознавание антигена. Вариабельная область, как правило, содержит по меньшей мере три CDR тяжелой или легкой цепей (Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Public Health Service N.I.H., Bethesda, Md.; см., также Chothia and Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al., 1989, Nature 342: 877-883) в пределах каркасной области (обозначенной как каркасные области 1-4, FR1, FR2, FR3 и FR4 согласно Kabat et al., 1991; см. также Chothia and Lesk, 1987, выше).

[0085] Антитела могут содержать любую константную область, известную из уровня техники. Легкие цепи человека классифицируют как легкие каппа- и лямбда-цепи. Тяжелые цепи классифицируют как мю-, дельта-, гамма-, альфа- или эpsilon-цепи, и они определяют изотип антитела как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE соответственно. IgG имеет несколько подклассов, в том числе без ограничения IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. IgM имеет подклассы, в том числе без ограничения IgM1 и IgM2. Варианты осуществления настоящего изобретения включают все такие классы или изотипы антител. Константная область легкой цепи может представлять собой, например, константную область легкой цепи каппа- или лямбда-типа, например, константную область легкой цепи каппа- или лямбда-типа человека. Константная область тяжелой цепи может представлять собой, например, константные области тяжелой цепи альфа-, дельта-, эpsilon-, гамма- или мю-типа, например, константную область тяжелой цепи альфа-, дельта-, эpsilon-, гамма- или мю-типа человека. Соответственно, в иллюстративных вариантах осуществления антитело представляет собой антитело изотипа IgA, IgD, IgE, IgG или IgM, в том числе любое из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

[0086] Антитело может представлять собой моноклональное антитело или поликлональное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность, которая является существенно сходной с встречающимся в природе антителом, продуцируемым млекопитающим, например, мышью, кроликом, козой, лошастью, курицей, хомяком, человеком и т. п. В этом отношении антитело можно рассматривать как антитело млекопитающего, например, антитело мыши, антитело кролика, антитело козы, антитело лошади, антитело курицы, антитело хомяка, антитело человека и т. п. В определенных аспектах антитело представляет собой антитело человека. В определенных аспектах антитело представляет собой химерное антитело или гуманизированное антитело. Термин "химерное антитело" относится к антителу, содержащему домены из двух или более различных антител. Химерное антитело может, например, содержать константные домены от одного вида и вариабельные домены от второго или, в более общем случае, может содержать участки аминокислотной последовательности от по меньшей мере двух видов. Химерное антитело также может содержать домены двух или более различных антител от одного и того же вида. Термин "гуманизированное" при использовании в отношении антител относится к антителам, имеющим по меньшей мере области CDR из источника, отличного от человека, сконструированные таким образом, чтобы они имели структуру и иммунологическую функцию, более сходные с таковыми у настоящих антител человека, чем у антител из

исходного источника. Например, гуманизация может включать прививание CDR из антитела, отличного от антитела человека, такого как антитело мыши, на антитело человека. Гуманизация также может включать селективные аминокислотные замены для получения последовательности, отличной от последовательности человека, более сходной с последовательностью человека.

[0087] Антитело можно расщеплять на фрагменты с помощью ферментов, таких как, например, папаин и пепсин. Папаин расщепляет антитело с образованием двух Fab-фрагментов и одного Fc-фрагмента. Пепсин расщепляет антитело с образованием $F(ab')_2$ -фрагмента и pFc' -фрагмента. В иллюстративных аспектах настоящего изобретения антигенсвязывающий белок по настоящему изобретению содержит антигенсвязывающий фрагмент антитела. Используемый в данном документе термин "антигенсвязывающий фрагмент антитела" относится к части молекулы антитела, которая способна к связыванию антигена антитела и также известна как "антигенсвязывающий фрагмент" или "антигенсвязывающая часть". В иллюстративных примерах антигенсвязывающий фрагмент антитела представляет собой Fab-фрагмент или $F(ab')_2$ -фрагмент.

[0088] Архитектуру антител использовали для создания растущего спектра альтернативных форматов, который охватывает диапазон молекулярных масс по меньшей мере приблизительно 12-150 кДа и характеризуется диапазоном валентности (n) от мономерных ($n=1$), до димерных ($n=2$), до тримерных ($n=3$), до тетрамерных ($n=4$) и потенциально более высокого порядка; такие альтернативные форматы в данном документе называются "белковыми продуктами на основе антител". Белковые продукты на основе антител включают белковые продукты на основе структуры полного антитела и белковые продукты, которые имитируют фрагменты антитела, сохраняющие полную антигенсвязывающую способность, например, scFv, Fab и VHH/VN (обсуждаемые ниже). Наименьшим антигенсвязывающим фрагментом антитела, который сохраняет свой полный антигенсвязывающий участок, является Fv-фрагмент, который полностью состоит из переменных (V) областей. Растворимый гибкий аминокислотный пептидный линкер используют для соединения V-областей в scFv-фрагмент (одноцепочечный переменный фрагмент) для стабилизации молекулы, или к V-областям добавляют константные (C) домены с получением Fab-фрагмента [антигенсвязывающего фрагмента]. Как scFv-, так и Fab-фрагменты могут быть легко получены в клетках-хозяевах, например, прокариотических клетках-хозяевах. Другие белковые продукты на основе антител включают scFv, стабилизированный дисульфидными связями (ds-scFv), одноцепочечный Fab (scFab), а также ди- и мультимерные форматы антител, такие как диа-, триа- и тетрамера, или миниантитела (мини-Ab), которые включают различные форматы, состоящие из scFv, связанных с олигомеризационными доменами. Наименьшие фрагменты представляют собой VHH/VN из тяжелой цепи Ab верблюда, а также однодоменные Ab (sdAb). Структурным элементом, который чаще всего используется для создания новых форматов антитела, является фрагмент антитела, представляющий собой одноцепочечный переменный (V) домен (scFv), который содержит V-домены из тяжелой

и легкой цепей (домен VH и VL), связанные с помощью пептидного линкера из ~ 15 аминокислотных остатков. Пептидное антитело или продукт слияния пептид-Fc представляют собой еще один белковый продукт на основе антитела. Структура пептидного антитела состоит из биологически активного пептида, привитого на Fc-домен. Пептидные антитела хорошо описаны в уровне техники. См., например, Shimamoto et al., mAbs 4(5): 586-591 (2012).

[0089] Другие белковые продукты на основе антител включают одноцепочечное антитело (SCA); диатело; триатело; тетратело; биспецифические или триспецифические антитела и т. п. Биспецифические антитела можно разделить на пять основных классов: BsIgG, присоединенные IgG, фрагменты BsAb, биспецифические слитые белки и конъюгаты BsAb. См., например, Spiess et al., Molecular Immunology 67(2) Part A: 97-106 (2015).

[0090] В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок по настоящему изобретению содержит любой из таких белковых продуктов на основе антител. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок по настоящему изобретению содержит любое из scFv, Fab, VHH/VH, Fv-фрагмента, ds-scFv, scFab, димерного антитела, мультимерного антитела (например, диатела, триатела, тетратела), мини-Ab, пептидного антитела, VHH/VH тяжелой цепи антитела верблюда, sdAb, диатела; триатела; тетратела; биспецифического или триспецифического антитела, BsIgG, присоединенного IgG, фрагмента BsAb, биспецифического слитого белка и конъюгата BsAb.

[0091] В иллюстративных примерах антигенсвязывающий белок по настоящему изобретению содержит белковый продукт на основе антитела в мономерной форме или полимерной, олигомерной или мультимерной форме. В определенных вариантах осуществления, в которых антитело содержит два или более различных фрагментов антигенсвязывающих областей, антитело считается биспецифическим, триспецифическим, или полиспецифическим, или бивалентным, тривалентным или поливалентным в зависимости от количества различных эпитопов, которые распознаются и связываются антителом. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок по настоящему изобретению представляет собой биспецифическое антитело (bsAb), содержащее два scFv, один из которых связывается с TIGIT, а другой связывается с CD112R. В различных аспектах scFv, который связывается с CD112R, содержит переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи 29E10, 24F1 или 11E4. В различных аспектах scFv, который связывается с TIGIT, содержит переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи 43B7.002.015, 66H9.009 или 58A7.002.008. В иллюстративных примерах каждый scFv связан с тяжелой цепью и/или легкой цепью, необязательно с тяжелой цепью IgG и/или легкой цепью IgG.

[0092] *Структура антигенсвязывающих белков*

[0093] В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент), содержит (а) аминокислотную последовательность определяющей комплементарности области (CDR) 1

тяжелой цепи (НС), представленную в таблице A1, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами (например, 1, 2, 3, 4 аминокислотами), или которая характеризуется на по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности; (b) аминокислотную последовательность CDR2 НС, представленную в таблице A1, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется на по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности; (c) аминокислотную последовательность CDR3 НС, представленную в таблице A1, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется на по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности; (d) аминокислотную последовательность CDR1 легкой цепи (LC), представленную в таблице A1, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности; (e) аминокислотную последовательность CDR2 LC, представленную в таблице A1, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности; (f) аминокислотную последовательность CDR3 LC, представленную в таблице A1, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется на по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности, или (g) комбинацию любых двух, трех, четырех, пяти или шести из (a)-(f).

ТАБЛИЦА A1. SEQ ID NO CDR антигенсвязывающих белков, связывающих CD112R

	Тяжелая цепь (НС)			Легкая цепь (LC)		
Название	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3
1E1	13	14	15	16	17	18
1E1.016	23	24	25	26	27	28
24F1	33	34	35	36	37	38
29E10	43	44	45	46	47	48
24F1.001	53	54	55	56	57	58
29E10_CONS.020	63	64	65	66	67	68
29E10_CONS.021	73	74	75	76	77	78
29E10_CONS.022	83	84	85	86	87	88
29E10_CONS.025	93	94	95	96	97	98
11E4	103	104	105	106	107	108
31B3	233	234	235	236	237	238

27G12	1973	1974	1975	1976	1977	1978
28F9	1983	1984	1985	1986	1987	1988
28H7	1993	1994	1995	1996	1997	1998
36C8	2003	2004	2005	2006	2007	2008

1E1 также известен как 18C10.

[0094] В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент), содержит аминокислотную последовательность CDR1 LC, аминокислотную последовательность CDR2 LC и аминокислотную последовательность CDR3 LC, представленные в таблице A1, и по меньшей мере 1 или 2 аминокислотные последовательности CDR HC, представленные в таблице A1. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, содержит аминокислотную последовательность CDR1 HC, аминокислотную последовательность CDR2 HC и аминокислотную последовательность CDR3 HC, представленные в таблице A1, и по меньшей мере 1 или 2 аминокислотные последовательности CDR LC, представленные в таблице A1. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, содержит все три такие CDR. В иллюстративных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, содержит 3, 4, 5 или все 6 аминокислотных последовательностей, обозначенных SEQ ID NO в одной строке таблицы A1. В иллюстративных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, содержит каждую из аминокислотных последовательностей CDR LC, обозначенных SEQ ID NO, из одной строки таблицы A1, и по меньшей мере 1 или 2 аминокислотные последовательности CDR HC, обозначенные SEQ ID NO в той же одной строке или в другой одной строке таблицы A1. В иллюстративных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, содержит каждую из аминокислотных последовательностей CDR HC, обозначенных SEQ ID NO, из одной строки таблицы A1, и по меньшей мере 1 или 2 аминокислотные последовательности CDR LC, обозначенные SEQ ID NO в той же одной строке или в другой одной строке таблицы A1. В иллюстративных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, содержит шесть аминокислотных последовательностей CDR, перечисленных в одной строке таблицы A1, или содержит шесть аминокислотных последовательностей CDR, выбранных из группы, состоящей из: (a) SEQ ID NO: 13-18; (b) SEQ ID NO: 23-28; (c) SEQ ID NO: 33-38; (d) SEQ ID NO: 43-48; (e) SEQ ID NO: 53-58; (f) SEQ ID NO: 63-68; (g) SEQ ID NO: 73-78; (h) SEQ ID NO: 83-88, (i) SEQ ID NO: 93-98, (j) SEQ ID NO: 103-108, (k) SEQ ID NO: 233-238, (l) SEQ ID NO: 1973-1978, (m) SEQ ID NO: 1983-1988, (n) SEQ ID NO: 1993-1998 и (o) SEQ ID NO: 2003-2008. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, содержит шесть аминокислотных последовательностей CDR, как описано выше, и константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2019 или SEQ ID NO: 2020.

[0095] В иллюстративных примерах аминокислотные последовательности из таблицы A1 разделены по меньшей мере одной или несколькими (например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше) промежуточными аминокислотами, например, каркасными остатками. В иллюстративных примерах между последовательностями CDR1 LC и CDR2 LC находится от приблизительно 10 до приблизительно 20 аминокислот, и между последовательностями CDR2 LC и CDR3 LC находится от приблизительно 25 до приблизительно 40 аминокислот. В иллюстративных примерах между последовательностями CDR1 LC и CDR2 LC находится от приблизительно 14 до приблизительно 16 аминокислот, и между последовательностями CDR2 LC и CDR3 LC находится от приблизительно 30 до приблизительно 35 аминокислот. В иллюстративных примерах между последовательностями CDR1 HC и CDR2 HC находится от приблизительно 10 до приблизительно 20 аминокислот, и между последовательностями CDR2 HC и CDR3 HC находится от приблизительно 25 до приблизительно 40 аминокислот. В иллюстративных примерах между последовательностями CDR1 HC и CDR2 HC находится от приблизительно 14 до приблизительно 16 аминокислот, и между последовательностями CDR2 HC и CDR3 HC находится от приблизительно 30 до приблизительно 35 аминокислот. В иллюстративных аспектах промежуточные аминокислоты содержат каркасную область.

[0096] В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент), содержит (a) аминокислотную последовательность определяющей комплементарность области (CDR) 1 тяжелой цепи (HC), представленную в таблице A2, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами (например, 1, 2, 3, 4 аминокислотами), или которая характеризуется на по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности; (b) аминокислотную последовательность CDR2 HC, представленную в таблице A2, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется на по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности; (c) аминокислотную последовательность CDR3 HC, представленную в таблице A2, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется на по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности; (d) аминокислотную последовательность CDR1 легкой цепи (LC), представленную в таблице A2, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности; (e) аминокислотную последовательность CDR2 LC, представленную в таблице A2, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности; (f) аминокислотную последовательность CDR3 LC, представленную в таблице A2, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4

аминокислотами, или которая характеризуется на по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности, или (g) комбинацию любых двух, трех, четырех, пяти или шести из (a)-(f).

ТАБЛИЦА A2. SEQ ID NO CDR антигенсвязывающих белков, связывающих TIGIT

	Тяжелая цепь (HC)			Легкая цепь (LC)		
Название	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3
55G7.041.008	113	114	115	116	117	118
58A7.003.008.075	123	124	125	126	127	128
4G10	133	134	135	136	137	138
11A3	143	144	145	146	147	148
28B8	153	154	155	156	157	158
39D2	163	164	165	166	167	168
43B7	173	174	175	176	177	178
55G7	183	184	185	186	187	188
66H9	193	194	195	196	197	198
43B7.002.015	203	204	205	206	207	208
58A7.003.008	213	214	215	216	217	218
66H9.009	223	224	225	226	227	228
58A7	2013	2014	2015	2016	2017	2018

*58A7 также известен как 48B7

[0097] В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент), содержит аминокислотную последовательность CDR1 LC, аминокислотную последовательность CDR2 LC и аминокислотную последовательность CDR3 LC, представленные в таблице A2, и по меньшей мере 1 или 2 аминокислотные последовательности CDR HC, представленные в таблице A2. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, содержит аминокислотную последовательность CDR1 HC, аминокислотную последовательность CDR2 HC и аминокислотную последовательность CDR3 HC, представленные в таблице A2, и по меньшей мере 1 или 2 аминокислотные последовательности CDR LC, представленные в таблице A2. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, содержит все три такие CDR. В иллюстративных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, содержит 3, 4, 5 или все 6 аминокислотных последовательностей, обозначенных SEQ ID NO в одной строке таблицы A2. В иллюстративных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, содержит каждую из аминокислотных последовательностей CDR LC, обозначенных SEQ ID NO, из одной

строки таблицы A2, и по меньшей мере 1 или 2 аминокислотные последовательности CDR HC, обозначенные SEQ ID NO в той же одной строке или в другой одной строке таблицы A2. В иллюстративных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, содержит каждую из аминокислотных последовательностей CDR HC, обозначенных SEQ ID NO, из одной строки таблицы A2, и по меньшей мере 1 или 2 аминокислотные последовательности CDR LC, обозначенные SEQ ID NO в той же одной строке или в другой одной строке таблицы A2. В иллюстративных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, содержит шесть аминокислотных последовательностей CDR, перечисленных в одной строке таблицы A2, или содержит шесть аминокислотных последовательностей CDR, выбранных из группы, состоящей из: (a) SEQ ID NO: 113-118; (b) SEQ ID NO: 123-128; (c) SEQ ID NO: 133-138; (d) SEQ ID NO: 143-148; (e) SEQ ID NO: 153-158; (f) SEQ ID NO: 163-168; (g) SEQ ID NO: 173-178; (h) SEQ ID NO: 183-188, (i) SEQ ID NO: 193-198, (j) SEQ ID NO: 203-208, (k) SEQ ID NO: 213-218, (l) SEQ ID NO: 223-228 и (m) SEQ ID NO: 2013-2018. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, содержит шесть аминокислотных последовательностей CDR, как описано выше, и константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2019 или SEQ ID NO: 2020.

[0098] В иллюстративных примерах аминокислотные последовательности из таблицы A2 разделены по меньшей мере одной или несколькими (например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше) промежуточными аминокислотами, например, каркасными остатками. В иллюстративных примерах между последовательностями CDR1 LC и CDR2 LC находится от приблизительно 10 до приблизительно 20 аминокислот, и между последовательностями CDR2 LC и CDR3 LC находится от приблизительно 25 до приблизительно 40 аминокислот. В иллюстративных примерах между последовательностями CDR1 LC и CDR2 LC находится от приблизительно 14 до приблизительно 16 аминокислот, и между последовательностями CDR2 LC и CDR3 LC находится от приблизительно 30 до приблизительно 35 аминокислот. В иллюстративных примерах между последовательностями CDR1 HC и CDR2 HC находится от приблизительно 10 до приблизительно 20 аминокислот, и между последовательностями CDR2 HC и CDR3 HC находится от приблизительно 25 до приблизительно 40 аминокислот. В иллюстративных примерах между последовательностями CDR1 HC и CDR2 HC находится от приблизительно 14 до приблизительно 16 аминокислот, и между последовательностями CDR2 HC и CDR3 HC находится от приблизительно 30 до приблизительно 35 аминокислот. В иллюстративных аспектах промежуточные аминокислоты содержат каркасную область.

[0099] В иллюстративных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент), содержит пару аминокислотных последовательностей варибельной области HC и варибельной области LC, перечисленных в одной строке таблицы B1, или содержит одну

из следующих пар аминокислотных последовательностей: (a) SEQ ID NO: 11-12; (b) SEQ ID NO: 21-22; (c) SEQ ID NO: 31-32; (d) SEQ ID NO: 41-42; (e) SEQ ID NO: 51-52; (f) SEQ ID NO: 61-62; (g) SEQ ID NO: 71-72; (h) SEQ ID NO: 81-82, (i) SEQ ID NO: 91-92, (j) SEQ ID NO: 101-102, (k) SEQ ID NO: 231-232, (l) SEQ ID NO: 1971-1972, (m) SEQ ID NO: 1981-1982, (n) SEQ ID NO: 1991-1992 или (o) SEQ ID NO: 2001-2002. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, содержит пару аминокислотных последовательностей вариательной области HC и вариательной области LC, как описано выше, и константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2019 или SEQ ID NO: 2020. В иллюстративных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, содержит пару аминокислотных последовательностей полноразмерной (FL) HC и FL LC, перечисленных в одной строке таблицы B1, или содержит одну из следующих пар аминокислотных последовательностей: (a) SEQ ID NO: 9-10; (b) SEQ ID NO: 19-20; (c) SEQ ID NO: 29-30; (d) SEQ ID NO: 39-40; (e) SEQ ID NO: 49-50; (f) SEQ ID NO: 59-60; (g) SEQ ID NO: 69-70; (h) SEQ ID NO: 79-80, (i) SEQ ID NO: 89-90, (j) SEQ ID NO: 99-100, (k) SEQ ID NO: 229-230, (l) SEQ ID NO: 1969-1970, (m) SEQ ID NO: 1979-1980, (n) SEQ ID NO: 1989-1990 или (o) SEQ ID NO: 1999-2000.

ТАБЛИЦА B1. SEQ ID NO вариательных областей и полноразмерных (FL) последовательностей антигенсвязывающих белков, связывающих CD112R

Название	FL HC	FL LC	Вариательная область HC	Вариательная область LC
1E1	9	10	11	12
1E1.016	19	20	21	22
24F1	29	30	31	32
29E10	39	40	41	42
24F1.001	49	50	51	52
29E10_CONS.020	59	60	61	62
29E10_CONS.021	69	70	71	72
29E10_CONS.022	79	80	81	82
29E10_CONS.025	89	90	91	92
11E4	99	100	101	102
31B3	229	230	231	232
27G12	1969	1970	1971	1972
28F9	1979	1980	1981	1982
28H7	1989	1990	1991	1992
36C8	1999	2000	2001	2002

[00100] В иллюстративных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент), содержит пару аминокислотных последовательностей вариательной области HC и вариательной области LC, перечисленных в одной строке таблицы B2, или содержит одну из следующих пар аминокислотных последовательностей: (a) SEQ ID NO: 111-112, (b) SEQ ID NO: 121-122, (c) SEQ ID NO: 131-132, (d) SEQ ID NO: 141-142, (e) SEQ ID NO: 151-152, (f) SEQ ID NO: 161-162, (g) SEQ ID NO: 171-172, (h) SEQ ID NO: 181-182, (i) SEQ ID NO: 191-192, (j) SEQ ID NO: 201-202, (k) SEQ ID NO: 211-212, (l) SEQ ID NO: 221-222 или (m) SEQ ID NO: 2011-2012. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, содержит пару аминокислотных последовательностей вариательной области HC и вариательной области LC, как описано выше, и константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2019 или SEQ ID NO: 2020. В иллюстративных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, содержит пару аминокислотных последовательностей полноразмерной (FL) HC и FL LC, перечисленных в одной строке таблицы B2, или содержит одну из следующих пар аминокислотных последовательностей: (a) SEQ ID NO: 109-110, (b) SEQ ID NO: 119-120, (c) SEQ ID NO: 129-130, (d) SEQ ID NO: 139-140, (e) SEQ ID NO: 149-150, (f) SEQ ID NO: 159-160, (g) SEQ ID NO: 169-170, (h) SEQ ID NO: 179-180, (i) SEQ ID NO: 189-190, (j) SEQ ID NO: 199-200, (k) SEQ ID NO: 209-210, (l) SEQ ID NO: 219-220 или (m) SEQ ID NO: 2009-2010.

ТАБЛИЦА B2. SEQ ID NO вариательных областей и полноразмерных (FL) последовательностей антигенсвязывающих белков, связывающих TIGIT

Название	FL HC	FL LC	Вариательная область HC	Вариательная область LC
55G7.041.008	109	110	111	112
58A7.003.008.075	119	120	121	122
4G10	129	130	131	132
11A3	139	140	141	142
28B8	149	150	151	152
39D2	159	160	161	162
43B7	169	170	171	172
55G7	179	180	181	182
66H9	189	190	191	192
43B7.002.015	199	200	201	202
58A7.003.008	209	210	211	212
66H9.009	219	220	221	222

58A7	2009	2010	2011	2012
------	------	------	------	------

[00101] В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, или антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, содержит аминокислотную последовательность, которая является сходной с вышеупомянутой аминокислотной последовательностью, при этом антигенсвязывающий белок по сути сохраняет свою биологическую функцию, например, свою способность связываться со своей мишенью или антигеном, например, TIGIT человека, CD112R человека, или снижать, блокировать, ингибировать, устранять или нарушать передачу сигнала в результате взаимодействия TIGIT со своим партнером по связыванию, CD155, или в результате взаимодействия CD112R со своим партнером по связыванию, CD112.

[00102] В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент), содержит аминокислотную последовательность, которая отличается только 1, 2, 3, 4, 5, 6 или больше аминокислотами относительно исходной аминокислотной последовательности, характеризующейся аминокислотной последовательностью, изложенной в таблице A1 или таблице B1. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, содержит аминокислотную последовательность, которая отличается только 1, 2, 3, 4, 5, 6 или больше аминокислотами относительно исходной аминокислотной последовательности, характеризующейся аминокислотной последовательностью, изложенной в таблице A2 или таблице B2. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок (например, антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, или антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT) содержит вариантную последовательность исходной последовательности, при этом данная вариантная последовательность отличается только одной или двумя аминокислотами относительно исходной последовательности. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок содержит одну или несколько аминокислотных замен, которые имеют место за пределами CDR, например, одна или несколько аминокислотных замен имеют место в пределах каркасной(каркасных) области(областей) тяжелой или легкой цепи. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок содержит одну или несколько аминокислотных замен, при этом антигенсвязывающий белок сохраняет аминокислотные последовательности шести CDR. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся только 1, 2, 3, 4, 5, 6 или больше консервативными аминокислотными заменами относительно исходной(исходных) последовательности(последовательностей). Используемый в данном документе термин "консервативная аминокислотная замена" означает замену одной аминокислоты другой аминокислотой, имеющей аналогичные свойства, например, размер, заряд, гидрофобность, гидрофильность и/или ароматичность, и включает замены в пределах одной из следующих пяти групп:

I. Небольшие алифатические неполярные или слабополярные остатки: Ala, Ser, Thr, Pro, Gly;

II. Полярные отрицательно заряженные остатки и их амиды и сложные эфиры: Asp, Asn, Glu, Gln, цистеиновая кислота и гомоцистеиновая кислота;

III. Полярные, положительно заряженные остатки: His, Arg, Lys; орнитин (Orn)

IV. Крупные алифатические неполярные остатки: Met, Leu, Ile, Val, Cys, норлейцин (Nle), гомоцистеин

V. Крупные ароматические остатки: Phe, Tyr, Trp, ацетилфенилаланин.

[00103] В иллюстративных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) содержит аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере одну аминокислотную замену относительно исходной последовательности, и аминокислотная(аминокислотные) замена(замены) представляет собой/представляют собой неконсервативную(неконсервативные) аминокислотную(аминокислотные) замену(замены). Используемый в данном документе термин "неконсервативная аминокислотная замена" определяется в данном документе как замена одной аминокислоты другой аминокислотой, имеющей другие свойства, например, размер, заряд, гидрофобность, гидрофильность и/или ароматичность, и включает замены за пределами вышеуказанных пяти групп.

[00104] В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) содержит аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере одну аминокислотную замену относительно исходной последовательности, и заменяющая аминокислота представляет собой встречающуюся в природе аминокислоту. Под "встречающейся в природе аминокислотой", или "стандартной аминокислотой", или "канонической аминокислотой" подразумевают одну из 20 альфа-аминокислот, обнаруживаемых у эукариот и кодируемых непосредственно кодонами универсального генетического кода (Ala, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, Trp, Ser, Thr, Asn, Gln, Cys, Gly, Pro, Arg, His, Lys, Asp, Glu). В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере одну аминокислотную замену относительно исходной последовательности, и заменяющая аминокислота является нестандартной аминокислотой или аминокислотой, которая не включается в состав белков в ходе трансляции. Нестандартные аминокислоты включают без ограничения: селеноцистеин, пирролизин, орнитин, норлейцин, β -аминокислоты (например, β -аланин, β -аминоизомасляную кислоту, β -фенилаланин, β -гомофенилаланин, β -глутаминовую кислоту, β -глутамин, β -гомотриптофан, β -лейцин, β -лизин), гомоаминокислоты (например, гомотриптофан, гомосерин, гомоаргинин, моноцистеин, гомоцистин), N-метиламинокислоты (например, L-абрин, N-метилаланин, N-метилизолейцин, N-метиллейцин), 2-аминокаприловую кислоту, 7-аминоцефалоспорановую кислоту, 4-аминокоричную кислоту, альфа-аминоциклогексанпропионовую кислоту, амино(4-гидроксифенил)уксусную кислоту, 4-аминоникотиновую кислоту, 3-аминофенилуксусную кислоту и т. п.

[00105] В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок содержит

аминокислотную последовательность, которая характеризуется более или приблизительно 30%, более или приблизительно 50% или более или приблизительно 70% идентичностью последовательности с исходной(исходными) аминокислотной(аминокислотными) последовательностью(последовательностями). В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или характеризуется более 90% идентичностью последовательности с исходной аминокислотной последовательностью. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или характеризуется более 90% идентичностью последовательности по всей длине исходной аминокислотной последовательности. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности по всей длине исходной аминокислотной последовательности.

[00106] В различных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент), содержит вариантную последовательность аминокислотной последовательности вариабельной области HC или вариантную последовательность аминокислотной последовательности вариабельной области LC, перечисленных в таблице B1, при этом вариантная последовательность отличается от последовательности из таблицы B1 только 1-12 (например, 1-11, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1 или 2) аминокислотами или характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности (например, по меньшей мере или приблизительно 80% идентичностью последовательности, по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности, по меньшей мере или приблизительно 95% идентичностью последовательности). В различных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, содержит вариантную последовательность аминокислотной последовательности FL HC или вариантную последовательность аминокислотной последовательности LC FL, перечисленных в таблице B1, при этом вариантная последовательность отличается от последовательности из таблицы B1 только 1-46 аминокислотами или характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности (например, по меньшей мере или приблизительно 80% идентичностью последовательности, по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности, по меньшей мере или приблизительно 95% идентичностью последовательности). В иллюстративных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, содержит пару аминокислотных последовательностей вариабельной области HC и вариабельной области LC, перечисленных в одной строке таблицы C1, или содержит одну из следующих пар аминокислотных последовательностей: (a) первые 100 аминокислот каждой из SEQ ID

NO: 241 и 242; (b) первые 100 аминокислот каждой из SEQ ID NO: 247 и 248; (c) первые 100 аминокислот каждой из SEQ ID NO: 249 и 250; (d) первые 100 аминокислот каждой из SEQ ID NO: 251 и 252 или (e) первые 100 аминокислот каждой из SEQ ID NO: 263 и 264. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, содержит первые 105, первые 106, первые 107, первые 108, первые 109, первые 110, первые 111, первые 112, первые 113, первые 114 или первые 115 аминокислот из SEQ ID NO: 242, SEQ ID NO: 248, SEQ ID NO: 250, SEQ ID NO: 252 или SEQ ID NO: 264, и/или первые 115, первые 116, первые 117, первые 118, первые 119, первые 120, первые 121, первые 122, первые 123, первые 124, первые 125, первые 126 или первые 127 аминокислот из SEQ ID NO: 241, SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 249, SEQ ID NO: 251 или SEQ ID NO: 263. В иллюстративных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, содержит пару аминокислотных последовательностей полноразмерной (FL) HC и FL LC, перечисленных в одной строке таблицы C1, или содержит одну из следующих пар аминокислотных последовательностей: (a) SEQ ID NO: 241-242; (b) SEQ ID NO: 247-248; (c) SEQ ID NO: 249-250; (d) SEQ ID NO: 251-252 или (e) SEQ ID NO: 263-264. В различных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, содержит аминокислотную последовательность FL LC, характеризующуюся нечетным номером SEQ ID NO., перечисленным в столбце "сконструированные*" таблицы C1, и аминокислотную последовательность FL HC, характеризующуюся SEQ ID NO. на единицу больше, чем SEQ ID NO. FL LC. В различных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, содержит по меньшей мере часть последовательности под любым из SEQ ID NO из таблицы C1, где часть содержит первые 100 аминокислот аминокислотной последовательности, первые 105 аминокислот аминокислотной последовательности, первые 110 аминокислот аминокислотной последовательности, первые 115 аминокислот аминокислотной последовательности или первые 120 аминокислот аминокислотной последовательности. В различных примерах антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, содержит по меньшей мере 2, 3, 4, 5 или 6 CDR аминокислотной последовательности из таблицы C1. CDR HC или LC данного антитела можно определить любым одним или несколькими способами, известными из уровня техники. См., например, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. of Health and Human Services, NIH (1991); Chothia et al., J Mol Biol 196: 901-917 (1987); Al-Lazikani et al., J Mol Biol 273: 927-948 (1997); Abhinandan et al., Mol Immunol 45: 3832-3839 (2008); Lefranc et al., The Immunologist 7: 132-136 (1999); Lefranc et al., Dev Comp Immunol 27: 55-77 (2003), и Honegger et al., J Mol Biol 309: 657-670 (2001).

ТАБЛИЦА C1. SEQ ID NO консенсусных последовательностей FL HC и LC антигенсвязывающих белков, связывающих CD112R, и их сконструированных версий

	Консенсусная последовательность FL HC	Консенсусная последовательность FL LC	Сконструированные*

29E10	241	242	509-614
1E1	247	248	265-336, 661-936
24F1	249	250	413-508
11E4	251	252	337-412, 619-636
31B3	263	264	615-618

*Сконструированные FL LC представляют собой нечетные числа, а FL HC представляют собой четные числа.

[00107] В различных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент), содержит вариантную последовательность аминокислотной последовательности вариабельной области HC или вариантную последовательность аминокислотной последовательности вариабельной области LC, перечисленных в таблице B2, при этом вариантная последовательность отличается от последовательности из таблицы B2 только 1-12 аминокислотами или характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности (например, по меньшей мере или приблизительно 80% идентичностью последовательности, по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности, по меньшей мере или приблизительно 95% идентичностью последовательности). В различных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, содержит вариантную последовательность аминокислотной последовательности FL HC или вариантную последовательность аминокислотной последовательности LC FL, перечисленных в таблице B2, при этом вариантная последовательность отличается от последовательности из таблицы B2 только 1-46 аминокислотами или характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности (например, по меньшей мере или приблизительно 80% идентичностью последовательности, по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности, по меньшей мере или приблизительно 95% идентичностью последовательности). В иллюстративных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, содержит пару аминокислотных последовательностей вариабельной области HC и вариабельной области LC, перечисленных в одной строке таблицы C2, или содержит одну из следующих пар аминокислотных последовательностей: (a) первые 100 аминокислот каждой из (a) SEQ ID NO: 239 и 240; (b) первые 100 аминокислот каждой из SEQ ID NO: 243 и 244; (c) первые 100 аминокислот каждой из SEQ ID NO: 245 и 246; (d) первые 100 аминокислот каждой из SEQ ID NO: 253 и 254; (e) первые 100 аминокислот каждой из SEQ ID NO: 255 и 256; (f) первые 100 аминокислот каждой из SEQ ID NO: 257 и 258, (g) первые 100 аминокислот каждой из SEQ ID NO: 259 и 260 или (h) первые 100 аминокислот каждой из SEQ ID NO: 261 и 262. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, содержит первые 105, первые 106, первые 107, первые 108, первые 109, первые 110, первые 111, первые 112, первые 113, первые 114 или первые 115 аминокислот из SEQ

ID NO: 240, SEQ ID NO: 244, SEQ ID NO: 246, SEQ ID NO: 254, SEQ ID NO: 256, SEQ ID NO: 258, SEQ ID NO: 260 или SEQ ID NO: 262, и/или первые 115, первые 116, первые 117, первые 118, первые 119, первые 120, первые 121, первые 122, первые 123, первые 124, первые 125, первые 126 или первые 127 аминокислот из SEQ ID NO: 239, SEQ ID NO: 243, SEQ ID NO: 245, SEQ ID NO: 253, SEQ ID NO: 255, SEQ ID NO: 257, SEQ ID NO: 259 или SEQ ID NO: 261. В иллюстративных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, содержит пару аминокислотных последовательностей полноразмерной (FL) HC и FL LC, перечисленных в одной строке таблицы C2, или содержит одну из следующих пар аминокислотных последовательностей: (a) SEQ ID NO: 239-240; (b) SEQ ID NO: 243-244; (c) SEQ ID NO: 245-246; (d) SEQ ID NO: 253-254; (e) SEQ ID NO: 255-256; (f) SEQ ID NO: 257-258, (g) SEQ ID NO: 259-260 или (h) SEQ ID NO: 261-262. В различных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, содержит аминокислотную последовательность FL LC, характеризующуюся нечетным номером SEQ ID NO., перечисленным в столбце "сконструированные*" таблицы C2, и аминокислотную последовательность FL HC, характеризующуюся SEQ ID NO. на единицу больше, чем SEQ ID NO. FL LC. В различных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, содержит по меньшей мере часть последовательности под любым из SEQ ID NO из таблицы C2, где часть содержит первые 100 аминокислот аминокислотной последовательности, первые 105 аминокислот аминокислотной последовательности, первые 110 аминокислот аминокислотной последовательности, первые 115 аминокислот аминокислотной последовательности или первые 120 аминокислот аминокислотной последовательности. В различных примерах антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, содержит по меньшей мере 2, 3, 4, 5 или 6 CDR аминокислотной последовательности из таблицы C2. CDR HC или LC данного антитела можно определить любым одним или несколькими способами, известными из уровня техники.

ТАБЛИЦА C2. SEQ ID NO консенсусных последовательностей FL HC и FL LC антигенсвязывающих белков, связывающих TIGIT, и их сконструированных версий

	Консенсусная последовательность FL HC	Консенсусная последовательность FL LC	Сконструированные*
66H9	239	240	655-660, 1953-1964
43B7	243	244	637-644, 937-1312, 1735-1736, 1825-1862
58A7	245	246	1313-1734, 1737-1740, 1929-1952, 1967-1968
4G10	253	254	1863-1912
28B8	255	256	1767-1780

55G7	257	258	645-654, 1913-1928
11A3	259	260	1741-1766
39D2	261	262	1781-1824, 1965-1966

*Сконструированные FL LC представляют собой нечетные числа, а FL HC представляют собой четные числа.

[00108] В различных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент), предусматривает антитело, антигенсвязывающий фрагмент антитела (например, Fab) или белковый продукт на основе антитела, например, scFv. В различных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, является бивалентным, содержащим два антигенсвязывающих сайта. В различных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, предусматривает антитело, антигенсвязывающий фрагмент антитела (например, Fab) или белковый продукт на основе антитела, например, scFv. В различных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, является бивалентным, содержащим два антигенсвязывающих сайта.

[00109] В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, например, антитело к TIGIT, содержит аминокислотную последовательность варибельной области LC, которая является в высокой степени сходной с SEQ ID NO: 192 или SEQ ID NO: 222 или первыми 105-115 аминокислотами из SEQ ID NO: 240 (например, характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности (например, по меньшей мере или приблизительно 80% идентичностью последовательности, по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности, по меньшей мере или приблизительно 95% идентичностью последовательности), и аминокислотная последовательность варибельной области LC содержит глутаминовую кислоту в положении 1 (**Glu1**) или ее консервативную аминокислотную замену, глутамин в положении 27 (**Gln27**) или его консервативную аминокислотную замену, серин в положении 28 (**Ser28**) или его консервативную аминокислотную замену, серин в положении 91 (**Ser91**) или его консервативную аминокислотную замену, серин в положении 92 (**Ser92**) или его консервативную аминокислотную замену, серин в положении 93 (**Ser93**) или его консервативную аминокислотную замену, лейцин в положении 94 (**Leu94**) или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, например, антитело к TIGIT, содержит аминокислотную последовательность CDR1 LC, содержащую **Gln27** или его консервативную аминокислотную замену, **Ser28** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, например, антитело к TIGIT, содержит аминокислотную последовательность CDR2 LC, содержащую **Glu1** или его консервативную аминокислотную замену. В иллюстративных аспектах

антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, например, антитело к TIGIT, содержит аминокислотную последовательность CDR3 LC, содержащую **Ser91** или его консервативную аминокислотную замену, **Ser92** или его консервативную аминокислотную замену, **Ser93** или его консервативную аминокислотную замену, **Leu94** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, например, антитело к TIGIT, содержит аминокислотную последовательность вариабельной области LC, содержащую **Gln27** или его консервативную аминокислотную замену, которая образует водородную связь с аминокислотой TIGIT. В различных аспектах, когда антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, например, антитело к TIGIT, связан с TIGIT, аминокислотные остатки, указанные выше, располагаются на расстоянии от приблизительно 3 ангстрем до приблизительно 4 ангстрем от аминокислоты TIGIT.

[00110] В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, например, антитело к TIGIT, содержит аминокислотную последовательность вариабельной области HC, которая является в высокой степени сходной с SEQ ID NO: 191 или SEQ ID NO: 221 или первыми 115-127 аминокислотами из SEQ ID NO: 239 (например, характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности (например, по меньшей мере или приблизительно 80% идентичностью последовательности, по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности, по меньшей мере или приблизительно 95% идентичностью последовательности)) и содержит валин в положении 32 (**Val32**) или его консервативную аминокислотную замену, тирозин в положении 33 (**Tyr33**) или его консервативную аминокислотную замену, тирозин в положении 52 (**Tyr52**) или его консервативную аминокислотную замену, тирозин в положении 54 (**Tyr54**) или его консервативную аминокислотную замену, тирозин в положении 55 (**Tyr55**) или его консервативную аминокислотную замену, серин в положении 56 (**Ser56**) или его консервативную аминокислотную замену, глицин в положении 57 (**Gly57**) или его консервативную аминокислотную замену, глицин в положении 58 (**Gly58**) или его консервативную аминокислотную замену, треонин в положении 59 (**Thr59**) или его консервативную аминокислотную замену, тирозин в положении 60 (**Tyr60**) или его консервативную аминокислотную замену, пролин в положении 63 (**Pro63**) или его консервативную аминокислотную замену, аргинин в положении 66 (**Arg66**) или его консервативную аминокислотную замену, изолейцин в положении 102 (**Ile102**) или его консервативную аминокислотную замену, аланин в положении 104 (**Ala104**) или его консервативную аминокислотную замену, глицин в положении 107 (**Gly107**) или его консервативную аминокислотную замену, тирозин в положении 108 (**Tyr108**) или его консервативную аминокислотную замену, фенилаланин в положении 109 (**Phe109**) или его консервативную аминокислотную замену, тирозин в положении 110 (**Tyr110**) или его консервативную аминокислотную замену, тирозин в положении 111 (**Tyr111**) или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию. В иллюстративных

аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, например, антитело к TIGIT, содержит аминокислотную последовательность CDR1 HC, содержащую **Val32** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr33** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, например, антитело к TIGIT, содержит аминокислотную последовательность CDR2 HC, содержащую **Tyr52** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr54** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr55** или его консервативную аминокислотную замену, **Ser56** или его консервативную аминокислотную замену, **Gly57** или его консервативную аминокислотную замену, **Gly58** или его консервативную аминокислотную замену, **Thr59** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr60** или его консервативную аминокислотную замену, **Pro63** или его консервативную аминокислотную замену, **Arg66** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, например, антитело к TIGIT, содержит аминокислотную последовательность CDR3 HC, содержащую **Ile102** или его консервативную аминокислотную замену, **Ala104** или его консервативную аминокислотную замену, **Gly107** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr108** или его консервативную аминокислотную замену, **Phe109** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr110** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr111** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию. В различных аспектах каждый из **Tyr52**, **Ser56**, **Thr59**, **Phe109**, **Tyr55**, **Tyr60** или его консервативная аминокислотная замена образует водородную связь с аминокислотой TIGIT. В различных аспектах, когда антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, например, антитело к TIGIT, связан с TIGIT, каждый из аминокислотных остатков, указанных выше, располагается на расстоянии от приблизительно 3 ангстрем до приблизительно 4 ангстрем от аминокислоты TIGIT. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, например, антитело к TIGIT, содержит аминокислотную последовательность вариабельной области HC, содержащую **Arg66** или его консервативную аминокислотную замену, которая образует солевой мостик с аминокислотой TIGIT. В различных аспектах **Tyr52** и **Thr59** образуют водородную связь с одной и той же аминокислотой TIGIT. В различных примерах **Ser56** образует водородную связь с двумя разными аминокислотами TIGIT.

[00111] В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, например, антитело к TIGIT, содержит аминокислотную последовательность вариабельной области LC, которая является в высокой степени сходной с SEQ ID NO: 122, или 212, или 2012, или первыми 105-115 аминокислотами из SEQ ID NO: 246 (например, характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности (например, по меньшей мере или приблизительно 80% идентичностью последовательности, по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности, по меньшей мере или приблизительно 95%

идентичностью последовательности)) и содержит глутаминовую кислоту в положении 1 (**Glu1**) или ее консервативную аминокислотную замену, изолейцин в положении 2 (**Ile2**) или его консервативную аминокислотную замену, глутамин в положении 27 (**Gln27**) или его консервативную аминокислотную замену, серин в положении 28 (**Ser28**) или его консервативную аминокислотную замену, валин в положении 29 (**Val29**) или его консервативную аминокислотную замену, серин в положении 30 (**Ser30**) или его консервативную аминокислотную замену, серин в положении 31 (**Ser31**) или его консервативную аминокислотную замену, треонин в положении 32 (**Thr32**) или его консервативную аминокислотную замену, тирозин в положении 33 (**Tyr33**) или его консервативную аминокислотную замену, серин в положении 68 (**Ser68**) или его консервативную аминокислотную замену, глицин в положении 69 (**Gly69**) или его консервативную аминокислотную замену, тирозин в положении 92 (**Tyr92**) или его консервативную аминокислотную замену, аспартат в положении 93 (**Asp93**) или его консервативную аминокислотную замену, валин в положении 94 (**Val94**) или его консервативную аминокислотную замену, серин в положении 95 (**Ser95**) или его консервативную аминокислотную замену, пролин в положении 96 (**Pro96**) или его консервативную аминокислотную замену, триптофан в положении 97 (**Trp97**) или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, например, антитело к TIGIT, содержит аминокислотную последовательность CDR1 LC, содержащую **Gln27** или его консервативную аминокислотную замену, **Ser28** или его консервативную аминокислотную замену, **Val29** или его консервативную аминокислотную замену, **Ser30** или его консервативную аминокислотную замену, **Ser31** или его консервативную аминокислотную замену, **Thr32** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr33** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, например, антитело к TIGIT, содержит аминокислотную последовательность CDR2 LC, содержащую **Glu1** или его консервативную аминокислотную замену, **Ile2** или его консервативную аминокислотную замену, **Ser68** или его консервативную аминокислотную замену, **Gly69** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, например, антитело к TIGIT, содержит аминокислотную последовательность CDR3 LC, содержащую **Tyr92** или его консервативную аминокислотную замену, **Asp93** или его консервативную аминокислотную замену, **Val94** или его консервативную аминокислотную замену, **Ser95** или его консервативную аминокислотную замену, **Pro96** или его консервативную аминокислотную замену, **Trp97** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, например, антитело к TIGIT, содержит аминокислотную последовательность вариабельной области LC, содержащую **Asp93** или его консервативную аминокислотную замену, **Ser95** или его консервативную

аминокислотную замену, **Tyr33** или его консервативную аминокислотную замену, каждое из которых образует водородную связь с аминокислотой TIGIT. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, например, антитело к TIGIT, содержит аминокислотную последовательность вариабельной области LC, содержащую **Asp93** или его консервативную аминокислотную замену, которая образует солевой мостик с аминокислотой TIGIT. В различных аспектах, когда антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, например, антитело к TIGIT, связан с TIGIT, аминокислотные остатки, указанные выше, располагаются на расстоянии от приблизительно 3 ангстрем до приблизительно 4 ангстрем от аминокислоты TIGIT.

[00112] В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, например, антитело к TIGIT, содержит аминокислотную последовательность вариабельной области HC, которая является в высокой степени сходной с SEQ ID NO: 121 или 211 или первыми 115-127 аминокислотами из SEQ ID NO: 245 (например, характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности (например, по меньшей мере или приблизительно 80% идентичностью последовательности, по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности, по меньшей мере или приблизительно 95% идентичностью последовательности)) и содержит глицин в положении 32 (**Gly32**) или его консервативную аминокислотную замену, тирозин в положении 35 (**Tyr35**) или его консервативную аминокислотную замену, тирозин в положении 52 (**Tyr52**) или его консервативную аминокислотную замену, тирозин в положении 54 (**Tyr54**) или его консервативную аминокислотную замену, тирозин в положении 55 (**Tyr55**) или его консервативную аминокислотную замену, серин в положении 56 (**Ser56**) или его консервативную аминокислотную замену, серин в положении 58 (**Ser58**) или его консервативную аминокислотную замену, треонин в положении 59 (**Thr59**) или его консервативную аминокислотную замену, фенилаланин в положении 60 (**Phe60**) или его консервативную аминокислотную замену, пролин в положении 63 (**Pro63**) или его консервативную аминокислотную замену, лизин в положении 66 (**Lys66**) или его консервативную аминокислотную замену, аргинин в положении 102 (**Arg102**) или его консервативную аминокислотную замену, аспарагин в положении 104 (**Asn104**) или его консервативную аминокислотную замену, триптофан в положении 105 (**Trp105**) или его консервативную аминокислотную замену, аспарагин в положении 106 (**Asn106**) или его консервативную аминокислотную замену, тирозин в положении 107 (**Tyr107**) или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, например, антитело к TIGIT, содержит аминокислотную последовательность CDR1 HC, содержащую **Gly32** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr35** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, например, антитело к TIGIT, содержит аминокислотную последовательность CDR2 HC, содержащую **Tyr52** или его

консервативную аминокислотную замену, **Tyr54** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr55** или его консервативную аминокислотную замену, **Ser56** или его консервативную аминокислотную замену, **Ser58** или его консервативную аминокислотную замену, **Thr59** или его консервативную аминокислотную замену, **Phe60** или его консервативную аминокислотную замену, **Pro63** или его консервативную аминокислотную замену, **Lys66** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, например, антитело к TIGIT, содержит аминокислотную последовательность CDR3 HC, содержащую **Arg102** или его консервативную аминокислотную замену, **Asn104** или его консервативную аминокислотную замену, **Trp105** или его консервативную аминокислотную замену, **Asn106** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr107** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию. В различных аспектах каждый из **Ser58, Asn106, Tyr107, Tyr35, Arg102 и Ser56** или его консервативная аминокислотная замена образует водородную связь с аминокислотой TIGIT. В различных аспектах, когда антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, например, антитело к TIGIT, связан с TIGIT, каждый из аминокислотных остатков, указанных выше, располагается на расстоянии от приблизительно 3 ангстрем до приблизительно 4 ангстрем от аминокислоты TIGIT.

[00113] В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, например, антитело к TIGIT, содержит аминокислотную последовательность варибельной области LC, которая является в высокой степени сходной с SEQ ID NO: 162 или первыми 105-115 аминокислотами из SEQ ID NO: 262 (например, характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности (например, по меньшей мере или приблизительно 80% идентичностью последовательности, по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности, по меньшей мере или приблизительно 95% идентичностью последовательности) и содержит аргинин в положении 30 (**Arg30**) или его консервативную аминокислотную замену, аргинин в положении 31 (**Arg31**) или его консервативную аминокислотную замену, тирозин в положении 32 (**Tyr32**) или его консервативную аминокислотную замену, серин в положении 91 (**Ser91**) или его консервативную аминокислотную замену, тирозин в положении 92 (**Tyr92**) или его консервативную аминокислотную замену, серин в положении 93 (**Ser93**) или его консервативную аминокислотную замену, треонин в положении 94 (**Thr94**) или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, например, антитело к TIGIT, содержит аминокислотную последовательность CDR1 LC, содержащую **Arg30** или его консервативную аминокислотную замену, **Arg31** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr32** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, например, антитело к TIGIT, содержит

аминокислотную последовательность CDR3 LC, содержащую **Ser91** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr92** или его консервативную аминокислотную замену, **Ser93** или его консервативную аминокислотную замену, **Thr94** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, например, антитело к TIGIT, содержит аминокислотную последовательность варибельной области LC, содержащую **Tyr32**, **Tyr92**, **Thr94**, **Arg30**, **Arg31** или их консервативную аминокислотную замену, каждое из которых образует водородную связь с аминокислотой TIGIT. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, например, антитело к TIGIT, содержит аминокислотную последовательность варибельной области LC, содержащую **Arg30** или его консервативную аминокислотную замену, которая образует солевой мостик с аминокислотой TIGIT. В различных аспектах, когда антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, например, антитело к TIGIT, связан с TIGIT, аминокислотные остатки, указанные выше, располагаются на расстоянии от приблизительно 3 ангстрем до приблизительно 4 ангстрем от аминокислоты TIGIT.

[00114] В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, например, антитело к TIGIT, содержит аминокислотную последовательность варибельной области HC, которая является в высокой степени сходной с SEQ ID NO: 161 или первыми 115-127 аминокислотами из SEQ ID NO: 261 (например, характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности (например, по меньшей мере или приблизительно 80% идентичностью последовательности, по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности, по меньшей мере или приблизительно 95% идентичностью последовательности)) и содержит треонин в положении 30 (**Thr30**) или его консервативную аминокислотную замену, глицин в положении 31 (**Gly31**) или его консервативную аминокислотную замену, тирозин в положении 32 (**Tyr32**) или его консервативную аминокислотную замену, тирозин в положении 33 (**Tyr33**) или его консервативную аминокислотную замену, триптофан в положении 47 (**Trp47**) или его консервативную аминокислотную замену, триптофан в положении 50 (**Trp50**) или его консервативную аминокислотную замену, серин в положении 52 (**Ser52**) или его консервативную аминокислотную замену, треонин в положении 54 (**Thr54**) или его консервативную аминокислотную замену, серин в положении 55 (**Ser55**) или его консервативную аминокислотную замену, аланин в положении 57 (**Ala57**) или его консервативную аминокислотную замену, треонин в положении 58 (**Thr58**) или его консервативную аминокислотную замену, глицин в положении 59 (**Gly59**) или его консервативную аминокислотную замену, тирозин в положении 60 (**Tyr60**) или его консервативную аминокислотную замену, глутамин в положении 65 (**Gln65**) или его консервативную аминокислотную замену, аспарагин в положении 101 (**Asn101**) или его консервативную аминокислотную замену, серин в положении 102 (**Ser102**) или его консервативную аминокислотную замену, валин в положении 103 (**Val103**) или его консервативную аминокислотную замену, лейцин в

положении 104 (**Leu104**) или его консервативную аминокислотную замену, тирозин в положении 105 (**Tyr105**) или его консервативную аминокислотную замену, тирозин в положении 106 (**Tyr106**) или его консервативную аминокислотную замену, тирозин в положении 107 (**Tyr107**) или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, например, антитело к TIGIT, содержит аминокислотную последовательность CDR1 HC, содержащую **Thr30** или его консервативную аминокислотную замену, **Gly31** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr32** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr33** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, например, антитело к TIGIT, содержит аминокислотную последовательность CDR2 HC, содержащую **Trp47** или его консервативную аминокислотную замену, **Trp50** или его консервативную аминокислотную замену, **Ser52** или его консервативную аминокислотную замену, **Thr54** или его консервативную аминокислотную замену, **Ser55** или его консервативную аминокислотную замену, **Ala57** или его консервативную аминокислотную замену, **Thr58** или его консервативную аминокислотную замену, **Gly59** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr60** или его консервативную аминокислотную замену, **Gln65** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, например, антитело к TIGIT, содержит аминокислотную последовательность CDR3 HC, содержащую **Asn101** или его консервативную аминокислотную замену, **Ser102** или его консервативную аминокислотную замену, **Val103** или его консервативную аминокислотную замену, **Leu104** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr105** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr106** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr107** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию. В различных аспектах каждый из **Leu104**, **Tyr33**, **Asn101**, **Tyr107**, **Tyr60**, **Ser55**, **Ser52** или его консервативная аминокислотная замена образует водородную связь с аминокислотой TIGIT. В различных аспектах, когда антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, например, антитело к TIGIT, связан с TIGIT, каждый из аминокислотных остатков, указанных выше, располагается на расстоянии от приблизительно 3 ангстрем до приблизительно 4 ангстрем от аминокислоты TIGIT.

[00115] В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, например, антитело к TIGIT, содержит аминокислотную последовательность варибельной области LC, которая является в высокой степени сходной с SEQ ID NO: 132 или первыми 105-115 аминокислотами из SEQ ID NO: 254 (например, характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности (например, по меньшей мере или приблизительно 80% идентичностью последовательности, по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности, по меньшей мере или приблизительно 95% идентичностью последовательности) и содержит глутамин

в положении 27 (**Gln27**) или его консервативную аминокислотную замену, лейцин в положении 30 (**Leu30**) или его консервативную аминокислотную замену, серин в положении 32 (**Ser32**) или его консервативную аминокислотную замену, серин в положении 96 (**Ser96**) или его консервативную аминокислотную замену, изолейцин в положении 97 (**Ile97**) или его консервативную аминокислотную замену, глутамин в положении 98 (**Gln98**) или его консервативную аминокислотную замену, лейцин в положении 99 (**Leu99**) или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, например, антитело к TIGIT, содержит аминокислотную последовательность CDR1 LC, содержащую **Gln27** или его консервативную аминокислотную замену, **Leu30** или его консервативную аминокислотную замену, **Ser32** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, например, антитело к TIGIT, содержит аминокислотную последовательность CDR3 LC, содержащую **Ser96** или его консервативную аминокислотную замену, **Ile97** или его консервативную аминокислотную замену, **Gln98** или его консервативную аминокислотную замену, **Leu99** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, например, антитело к TIGIT, содержит аминокислотную последовательность вариабельной области LC, содержащую **Ser32** или его консервативную аминокислотную замену и/или **Gln98** или его консервативную аминокислотную замену, каждое из которых образует водородную связь с аминокислотой TIGIT. В различных аспектах, когда антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, например, антитело к TIGIT, связан с TIGIT, аминокислотные остатки, указанные выше, располагаются на расстоянии от приблизительно 3 ангстрем до приблизительно 4 ангстрем от аминокислоты TIGIT.

[00116] В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, например, антитело к TIGIT, содержит аминокислотную последовательность вариабельной области HC, которая является в высокой степени сходной с SEQ ID NO: 131 или первыми 115-127 аминокислотами из SEQ ID NO: 253 (например, характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности (например, по меньшей мере или приблизительно 80% идентичностью последовательности, по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности, по меньшей мере или приблизительно 95% идентичностью последовательности)) и содержит аспарат в положении 33 (**Asp33**) или его консервативную аминокислотную замену, тирозин в положении 52 (**Tyr52**) или его консервативную аминокислотную замену, тирозин в положении 54 (**Tyr54**) или его консервативную аминокислотную замену, тирозин в положении 55 (**Tyr55**) или его консервативную аминокислотную замену, серин в положении 56 (**Ser56**) или его консервативную аминокислотную замену, глицин в положении 57 (**Gly57**) или его консервативную аминокислотную замену, глицин в положении 58 (**Gly58**) или его консервативную аминокислотную замену, треонин в

положении 59 (**Thr59**) или его консервативную аминокислотную замену, тирозин в положении 60 (**Tyr60**) или его консервативную аминокислотную замену, пролин в положении 63 (**Pro63**) или его консервативную аминокислотную замену, лизин в положении 66 (**Lys66**) или его консервативную аминокислотную замену, изолейцин в положении 102 (**Ile102**) или его консервативную аминокислотную замену, аланин в положении 104 (**Ala104**) или его консервативную аминокислотную замену, глицин в положении 107 (**Gly107**) или его консервативную аминокислотную замену, тирозин в положении 108 (**Tyr108**) или его консервативную аминокислотную замену, фенилаланин в положении 109 (**Phe109**) или его консервативную аминокислотную замену, тирозин в положении 110 (**Tyr110**) или его консервативную аминокислотную замену, фенилаланин в положении 111 (**Phe111**) или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, например, антитело к TIGIT, содержит аминокислотную последовательность CDR1 НС, содержащую **Asp33** или его консервативную аминокислотную замену. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, например, антитело к TIGIT, содержит аминокислотную последовательность CDR2 НС, содержащую **Tyr52** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr54** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr55** или его консервативную аминокислотную замену, **Ser56** или его консервативную аминокислотную замену, **Gly57** или его консервативную аминокислотную замену, **Gly58** или его консервативную аминокислотную замену, **Thr59** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr60** или его консервативную аминокислотную замену, **Pro63** или его консервативную аминокислотную замену, **Lys66** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, например, антитело к TIGIT, содержит аминокислотную последовательность CDR3 НС, содержащую **Ile102** или его консервативную аминокислотную замену, **Ala104** или его консервативную аминокислотную замену, **Gly107** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr108** или его консервативную аминокислотную замену, **Phe109** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr110** или его консервативную аминокислотную замену, **Phe111** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию. В различных аспектах каждый из **Tyr52**, **Ser56**, **Thr59**, **Tyr60**, **Phe109**, **Tyr54**, **Tyr55**, **Lys66** или их консервативная аминокислотная замена образует водородную связь с аминокислотой TIGIT. В различных аспектах, когда антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, например, антитело к TIGIT, связан с TIGIT, каждый из аминокислотных остатков, указанных выше, располагается на расстоянии от приблизительно 3 ангстрем до приблизительно 4 ангстрем от аминокислоты TIGIT.

[00117] В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, которая содержит набор мутаций с заменой пар заряженных аминокислот, описанных в данном документе. В конкретных аспектах аминокислотная последовательность тяжелой цепи содержит мутации с заменой

пар заряженных аминокислот, выбранные из мутаций с заменой пар заряженных аминокислот V1, V103 и V131.

[00118] В дополнительных иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок содержит одну или несколько аминокислотных модификаций относительно встречающегося в природе аналога для улучшения периода полужизни/стабильности или для того, чтобы сделать антитело более подходящим для экспрессии/возможности изготовления. В иллюстративных примерах антигенсвязывающий белок разработан для предотвращения или снижения взаимодействия между Fc и Fc-рецепторами. В иллюстративных примерах антигенсвязывающий белок представляет собой стабильное антитело без эффекторных функций (SEFL), содержащее константную область, которая не обладает способностью к взаимодействию с Fcγ-рецепторами. Антитела SEFL известны из уровня техники. См., например, Liu et al., J Biol Chem 292: 1876-1883 (2016); и Jacobsen et al., J. Biol. Chem. 292: 1865-1875 (2017). В иллюстративных аспектах антитело SEFL содержит одну или несколько из следующих мутаций, нумерация которых указана в соответствии с системой EU: L242C, A287C, R292C, N297G, V302C, L306C и/или K334C. В иллюстративных аспектах антитело SEFL содержит N297G. В иллюстративных аспектах антитело SEFL содержит A287C, N297G и L306C. В других иллюстративных аспектах антитело SEFL содержит R292C, N297G и V302C (т. е. SEFL2-2). В различных аспектах антигенсвязывающий белок содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2019, необязательно под SEQ ID NO: 2020.

[00119] В различных аспектах антигенсвязывающий белок представляет собой антитело, содержащее вариабельную область HC, кодируемую генным сегментом V семейства генных сегментов VH1, VH3 или VH4. В различных аспектах антигенсвязывающий белок представляет собой антитело, содержащее вариабельную область HC, кодируемую генным сегментом D семейства генных сегментов D1, D3, D5, D6 или D7. В различных аспектах антигенсвязывающий белок представляет собой антитело, содержащее вариабельную область HC, кодируемую генным сегментом J семейства генных сегментов JH4 или JH6. Необязательно антигенсвязывающий белок представляет собой антитело, содержащее вариабельную область HC, кодируемую генным сегментом V семейства генных сегментов VH3, и генным сегментом D семейства генных сегментов D1, D3 или D6, и/или генным сегментом J семейства генных сегментов JH4 или JH6. В различных примерах антигенсвязывающий белок представляет собой антитело, содержащее вариабельную область HC, кодируемую генным сегментом V семейства генных сегментов VH3, генным сегментом D семейства генов D1 и генным сегментом J семейства генных сегментов JH6. В различных примерах антигенсвязывающий белок представляет собой антитело, содержащее вариабельную область HC, кодируемую генным сегментом V семейства генных сегментов VH3, генным сегментом D семейства генов D3 и генным сегментом J семейства генных сегментов JH6. В различных примерах антигенсвязывающий белок представляет собой антитело, содержащее вариабельную

область HC, кодируемую генным сегментом V семейства генных сегментов VH3, генным сегментом D семейства генов D6 и генным сегментом J семейства генных сегментов JH6. В различных примерах антигенсвязывающий белок представляет собой антитело, содержащее вариабельную область HC, кодируемую генным сегментом V семейства генных сегментов VH1, генным сегментом D семейства генов D5 и генным сегментом J семейства генных сегментов JH6. В различных примерах антигенсвязывающий белок представляет собой антитело, содержащее вариабельную область HC, кодируемую генным сегментом V семейства генных сегментов VH4, генным сегментом D семейства генов D7 и генным сегментом J семейства генных сегментов JH6. В различных примерах антигенсвязывающий белок представляет собой антитело, содержащее вариабельную область HC, кодируемую генным сегментом V семейства генных сегментов VH3, генным сегментом D семейства генов D1 и генным сегментом J семейства генных сегментов JH4.

[00120] *Полипептиды*

[00121] В данном документе предусмотрены полипептиды, содержащие одну или несколько аминокислотных последовательностей из таблицы A1, или таблицы A2, или таблицы B1, или таблицы B2, или таблицы C1, или таблицы C2, состоящие по сути из них или состоящие из них. В различных аспектах полипептид содержит шесть CDR из таблицы A1 или таблицы A2 с промежуточными аминокислотами. В различных аспектах полипептид содержит только одну из аминокислотных последовательностей вариабельной области HC или вариабельной области LC из таблицы B1 или таблицы B2. В различных аспектах полипептид содержит как вариабельные аминокислотные последовательности HC, так и вариабельные аминокислотные последовательности LC из таблицы B1 или таблицы B2, слитые в виде одной последовательности, где необязательно аминокислотные последовательности вариабельной области HC и вариабельной области LC связаны друг с другом посредством линкерной последовательности. В различных примерах полипептид содержит две копии последовательности вариабельной области HC и две копии последовательностей вариабельной области LC, необязательно связанные друг с другом с помощью линкерных последовательностей. В некоторых аспектах полипептид содержит аминокислотную последовательность scFv₁, scFv₂ или (scFv)₂. В некоторых аспектах полипептид содержит аминокислотную последовательность диатела, триатела, однодоменного антитела, одиночного вариабельного домена, tandemного scFv, tascFv и т. п. В различных аспектах полипептид содержит только одну из аминокислотных последовательностей FL HC или FL LC из таблицы B1, или таблицы B2, или таблицы C1, или таблицы C2. В различных аспектах полипептид содержит обе аминокислотные последовательности FL HC и FL LC из таблицы B1, или таблицы B2, или таблицы C1, или таблицы C2, слитые в виде одной последовательности, где необязательно FL HC и FL LC связаны друг с другом посредством линкерной последовательности. В иллюстративных аспектах полипептид содержит вариантную последовательность исходной последовательности, содержащую аминокислотную последовательность из таблицы A1, или таблицы A2, или таблицы B1, или таблицы B2, или таблицы C1, или таблицы C2. В

различных аспектах полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая отличается только 1, 2, 3, 4, 5, 6 или больше аминокислотами относительно исходной последовательности. В иллюстративных аспектах полипептид содержит вариантную последовательность, которая отличается только одной или двумя аминокислотами относительно исходной последовательности. В иллюстративных аспектах полипептид содержит вариантную последовательность, характеризующуюся только 1, 2, 3, 4, 5, 6 или больше консервативными аминокислотными заменами относительно упомянутой(упомянутых) выше аминокислотной(аминокислотных) последовательности(последовательностей).

[00122] В иллюстративных аспектах полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая характеризуется более или приблизительно 30%, более или приблизительно 50% или более или приблизительно 70% идентичностью последовательности с исходной аминокислотной последовательностью. В иллюстративных аспектах полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или характеризуется более 90% идентичностью последовательности с исходной последовательностью. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или характеризуется более 90% идентичностью последовательности по всей длине исходной последовательности. В иллюстративных аспектах полипептид содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности по всей длине исходной последовательности.

[00123] В альтернативных или дополнительных вариантах осуществления по настоящему изобретению полипептид является липидизированным (например, миристоилированным, пальмитоилированным), гликозилированным, амидированным, карбоксилированным, фосфорилированным, этерифицированным, ацилированным, ацетилированным, циклизированным или превращенным в соль присоединения кислоты и/или необязательно димеризованным, или полимеризованным, или конъюгированным, как далее описано в данном документе.

[00124] В данном документе предусмотрены пептидомиметики, разработанные для имитации полипептида по настоящему изобретению. Пептидомиметики по сути сходны по структуре с полипептидом по настоящему изобретению, но характеризуются по меньшей мере одним структурным отличием. Например, пептидомиметик представляет собой пептоид, содержащий одну или несколько связей вместо одной или нескольких пептидных связей. В иллюстративных примерах пептоид содержит боковую цепь, которая соединена с атомом азота пептидного остова, а не с α -атомом углерода, как в пептидах. В некоторых аспектах в пептоидах по настоящему изобретению отсутствует водород

амидной группы, который отвечает за многие элементы вторичной структуры в пептидах и белках. См., например, Reyna et al., PNAS 89(20): 9367-9371 (1992).

[00125] Пептидомиметики, а также способы их получения известны из уровня техники. См., например, Advances in Amino Acid Mimetics and Peptidomimetics, Volumes 1 and 2, ed., Abell, A., JAI Press Inc., Greenwich, CT, 2006. В некоторых аспектах пептидомиметик представляет собой D-пептидный пептидомиметик, содержащий D-изомеры аминокислот. В некоторых аспектах пептидомиметик представляет собой пептоид, в котором боковая цепь аминокислоты присоединена к альфа-атому азота пептидного остова. Способы получения пептоидов известны из уровня техники. См., например, Zuckermann et al., JACS 114(26): 10646-10647 (1992) и Design, Synthesis, and Evaluation of Novel Peptoids, Fowler, Sarah, University of Wisconsin-Madison, 2008. В некоторых аспектах пептидомиметик представляет собой β -пептид, содержащий β -аминокислоты, аминогруппы которых связаны с β -атомом углерода, а не с альфа-атомом углерода. Способы получения β -пептидов известны из уровня техники. См., например, Seebach et al., Helvetica Chimica Acta 79(4): 913-941 (1996).

[00126] Аптамеры

[00127] В иллюстративных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок представляет собой аптамер. Недавние достижения в области комбинаторных наук позволили идентифицировать короткие полимерные последовательности (например, молекулы олигонуклеиновой кислоты или пептида) с высокой аффинностью и специфичностью к данной мишени. Например, технология SELEX была использована для идентификации аптамеров ДНК и РНК со связывающими свойствами, которые конкурируют с антителами млекопитающих, в области иммунологии были созданы и выделены антитела или фрагменты антител, которые связываются с множеством соединений, и фаговый дисплей был использован для обнаружения новых пептидных последовательностей с очень благоприятными связывающими свойствами. Основываясь на успехе этих методик молекулярной эволюции, безусловно могут быть получены молекулы, которые связываются с любой молекулой-мишенью. Петлевая структура часто связана с обеспечением требуемых свойств связывания, как в случае аптамеров, в которых часто используются шпильчатые петли, образованные из коротких областей без комплементарного спаривания оснований, антител природного происхождения, в которых используется комбинаторное расположение петлевых гипервариабельных областей, и новых библиотек фагового дисплея, в которых используются циклические пептиды, которые демонстрировали улучшенные результаты по сравнению с результатами фагового дисплея линейных пептидов. Таким образом, было получено достаточно доказательств, чтобы предположить, что высокоаффинные лиганды могут быть получены и идентифицированы посредством методик комбинаторной молекулярной эволюции. В случае настоящего изобретения можно использовать методики молекулярной эволюции для выделения соединений, специфических в отношении TIGIT или CD112R, которые ингибируют связывающее взаимодействие между TIGIT и CD155 или CD112R и CD112.

Для получения дополнительной информации об аптамерах см., в целом, Gold, L., Singer, B., He, Y. Y., Brody, E., "Aptamers As Therapeutic And Diagnostic Agents," J. Biotechnol. 74:5-13 (2000). Релевантные методики получения аптамеров можно найти в патенте США № 6699843, который включен посредством ссылки во всей своей полноте.

[00128] *Конъюгаты*

[00129] Настоящее изобретение также предусматривает конъюгаты, содержащие один или несколько антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению, связанных с гетерологичным фрагментом. Используемый в данном документе термин "гетерологичный фрагмент" синонимичен термину "конъюгированный фрагмент" и относится к любой молекуле (химической или биохимической, встречающейся в природе или неcodируемой), которая отличается от антигенсвязывающих белков, описанных в данном документе. Иллюстративные конъюгированные фрагменты, которые могут быть связаны с любым из антигенсвязывающих белков, описанных в данном документе, включают без ограничения гетерологичный пептид или полипептид, нацеливающееся средство, диагностическую метку, такую как радиоактивный изотоп, флуорофор или ферментативная метка, полимер, в том числе водорастворимые полимеры, или другие терапевтические или диагностические средства. Конъюгат в некоторых вариантах осуществления содержит один или несколько антигенсвязывающих белков, описанных в данном документе, и один или несколько из пептида (которые отличаются от антигенсвязывающих белков, описанных в данном документе), полипептида, молекулы нуклеиновой кислоты, другого антигена или его фрагмента, полимера, квантовой точки, малой молекулы, токсина, диагностического средства, углевода, аминокислоты.

[00130] В иллюстративных вариантах осуществления конъюгат по настоящему изобретению содержит антигенсвязывающий белок, описанный в данном документе, и гетерологичный фрагмент, который представляет собой полипептид (например, полипептид, отличающийся от любого из антигенсвязывающих белков, описанных в данном документе), и конъюгат представляет собой слитый полипептид, или слитый белок, или химерный белок, или химерный полипептид. Дополнительные описания таких конъюгатов предусмотрены в данном документе в разделе "*Слитые белки*".

[00131] В некоторых вариантах осуществления гетерологичный фрагмент присоединен посредством нековалентного или ковалентного связывания к антигенсвязывающему белку по настоящему изобретению. В иллюстративных аспектах связь между антигенсвязывающим белком и гетерологичным фрагментом достигается посредством ковалентных химических связей, например, пептидных связей, дисульфидных связей и т. п., или посредством физических сил, таких как электростатические, водородные, ионные, ван-дер-ваальсовы или гидрофобные или гидрофильные взаимодействия. Можно применять множество систем нековалентного связывания, в том числе, например, биотин-авидин, лиганд/рецептор, фермент/субстрат, нуклеиновая кислота/белок, связывающий нуклеиновую кислоту, липид/липидсвязывающий белок, партнеры молекул клеточной адгезии или любые

партнеры по связыванию или их фрагменты, которые характеризуются аффинностью друг к другу.

[00132] В иллюстративных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок связывается с конъюгированным фрагментом с помощью прямой ковалентной связи посредством реакции целевых аминокислотных остатков антигенсвязывающего белка с органическим дериватирующим средством, которое способно реагировать с выбранными боковыми цепями или N- или C-концевыми остатками этих целевых аминокислот. Реакционноспособные группы антигенсвязывающего белка или конъюгированного фрагмента включают, например, альдегидную группу, аминогруппу, сложноэфирную, тиольную, α -галогенацетильную, малеимидную или гидразиновую группу. Дериватирующие средства включают, например, малеимидобензоилсульфосукцинимидный сложный эфир (конъюгирование посредством остатков цистеина), N-гидроксисукцинимид (посредством остатков лизина), глутаровый альдегид, янтарный ангидрид или другие средства, известные из уровня техники. В качестве альтернативы, конъюгированные фрагменты могут быть связаны с антигенсвязывающим белком опосредованно с помощью промежуточных носителей, таких как полисахаридные или полипептидные носители. Примеры полисахаридных носителей включают аминодекстран. Примеры подходящих полипептидных носителей включают полилизин, полиглутаминовую кислоту, полиаспарагиновую кислоту, их сополимеры и смешанные полимеры этих аминокислот и других, например, остатков серина, для придания желаемых свойств растворимости полученному в результате нагруженному носителю.

[00133] Цистеинильные остатки наиболее часто подвергают реакции с α -галогенацетатами (и соответствующими аминами), такими как хлоруксусная кислота, хлорацетамид, с получением карбоксиметильных или карбоксиамидометильных производных. Цистеинильные остатки также дериватируют посредством реакции с бромтрифторацетоном, альфа-бром- β (5-имидазоил)пропионовой кислотой, хлорацетилфосфатом, N-алкилмалеимидами, 3-нитро-2-пиридилдисульфидом, метил-2-пиридилдисульфидом, п-хлорртутьбензоатом, 2-хлорртуть-4-нитрофенолом или хлор-7-нитробензо-2-окса-1,3-диазолом.

[00134] Гистидильные остатки дериватируют посредством реакции с диэтилпирокарбонатом при pH 5,5-7,0, так как данное средство является относительно специфичным для боковой цепи гистидила. Также применимым является парабромфенацилбромид; реакцию предпочтительно проводят в 0,1 М какодилата натрия при pH 6,0.

[00135] Лизинильные и аминоконцевые остатки подвергают реакции с ангидридами янтарной или других карбоновых кислот. Дериватизация этими средствами имеет эффект изменения заряда лизинильных остатков на противоположный. Другие подходящие реагенты для дериватизации остатков, содержащих альфа-аминогруппу, включают сложные имидоэфиры, такие как метилпиколинимидат; пиридоксальфосфат;

пиридоксаль, хлорборогидрид; тринитробензолсульфовую кислоту; О-метилизомочевину; 2,4-пентандион и глиоксилат в реакции, катализируемой трансаминазой.

[00136] Аргинильные остатки модифицируют посредством реакции с одним или несколькими традиционными реагентами, среди которых фенолглиоксаль, 2,3-бутандион, 1,2-циклогександион и нингидрин. Для дериватизации остатков аргинина необходимо, чтобы реакцию проводили в щелочных условиях из-за высокого значения рКа гуанидиновой функциональной группы. Кроме того, эти реагенты могут реагировать с группами лизина, а также с эpsilon-аминогруппой аргинина.

[00137] Специфическую модификацию тирозильных остатков можно проводить с особым интересом к введению спектральных меток в тирозильные остатки посредством реакции с ароматическими соединениями диазония или с тетранитрометаном. Для образования О-ацетилтирозильных соединений и 3-нитропроизводных чаще всего применяют соответственно N-ацетилимидзол и тетранитрометан.

[00138] Боковые карбоксильные группы (аспартильные или глутамильные) селективно модифицируют посредством реакции с карбодиимидами ($R-N=C=N-R'$), где R и R' представляют собой различные алкильные группы, такие как 1-циклогексил-3-(2-морфолинил-4-этил)карбодиимид или 1-этил-3-(4-азоний-4,4-диметилпентил)карбодиимид. Кроме того, аспартильные и глутамильные остатки превращают в аспарагинильные и глутаминильные остатки посредством реакции с ионами аммония.

[00139] Другие модификации включают гидроксилирование пролина и лизина, фосфорилирование гидроксильных групп серильных или треонильных остатков, метилирование альфа-аминогрупп боковых цепей лизина, аргинина и гистидина (Т. Е. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)), дезамидирование аспарагина или глутамина, ацетилирование N-концевого амина и/или амидирование или этерификация C-концевой группы карбоновой кислоты.

[00140] Другой тип ковалентной модификации включает химическое или ферментативное связывание гликозидов с антигенсвязывающим белком. Сахар(сахара) может(могут) быть присоединен(присоединены) к (a) аргинину и гистидину, (b) свободным карбоксильным группам, (c) свободным сульфгидрильным группам, таким как свободные сульфгидрильные группы цистеина, (d) свободным гидроксильным группам, таким как свободные гидроксильные группы серина, треонина или гидроксипролина, (e) ароматическим остаткам, таким как ароматические остатки тирозина или триптофана, или (f) амидной группе глутамина. Эти способы описаны в WO87/05330, опубликованной 11 сентября 1987 г., и в Aplin and Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306 (1981).

[00141] В иллюстративных аспектах гетерологичный фрагмент присоединен к антигенсвязывающему белку по настоящему изобретению посредством линкера. В некоторых аспектах линкер содержит цепь атомов длиной от 1 до приблизительно 60 или

от 1 до 30 атомов или длиннее, от 2 до 5 атомов, от 2 до 10 атомов, от 5 до 10 атомов или от 10 до 20 атомов. В некоторых вариантах осуществления все атомы цепи представляют собой атомы углерода. В некоторых вариантах осуществления атомы цепи остова линкера выбраны из группы, состоящей из C, O, N и S. Атомы цепи и линкеры можно выбирать в соответствии с их ожидаемой растворимостью (гидрофильностью) таким образом, чтобы получить более растворимый конъюгат. В некоторых вариантах осуществления в линкере предусмотрена функциональная группа, которая подвергается расщеплению посредством фермента или другого катализатора или гидролитических условий, обнаруживаемых в ткани-мишени, или органе-мишени, или клетке-мишени. В некоторых вариантах осуществления длина линкера является достаточно большой для уменьшения возможности стерического несоответствия. Если линкер представляет собой ковалентную связь или пептидную связь, а конъюгат представляет собой полипептид, то весь конъюгат может представлять собой слитый белок. Такие пептидные линкеры могут иметь любую длину. Иллюстративные пептидные линкеры имеют длину от приблизительно 1 до 50 аминокислот, имеют длину от 5 до 50, от 3 до 5, от 5 до 10, от 5 до 15 или от 10 до 30 аминокислот и являются гибкими или жесткими. В иллюстративных аспектах линкер представляет собой пептид, содержащий от приблизительно 2 до приблизительно 20 аминокислот. В иллюстративных аспектах линкер представляет собой пептид, содержащий от приблизительно 2 до приблизительно 15 аминокислот, от приблизительно 2 до приблизительно 10 аминокислот или от приблизительно 2 до приблизительно 5 аминокислот. Подходящие пептидные линкеры известны из уровня техники. См., например, Chen et al., *Adv Drug Delivery Reviews* 65(10): 1357-1369 (2013); Arai et al., *Protein Eng Des Sel* 14(8): 529-532 (2001); и Wriggers et al., *Curr Trends in Peptide Science* 80(6): 736-746 (2005). В иллюстративных аспектах линкер представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность GGGGS (SEQ ID NO: 2021).

[00142] *Слитые белки*

[00143] В иллюстративных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок связан с полипептидом, который отличается от любого из антигенсвязывающих белков, описанных в данном документе, и конъюгат представляет собой слитый полипептид, или слитый белок, или химерный белок, или химерный полипептид. Соответственно, настоящее изобретение предусматривает слитые полипептиды или слитые белки, содержащие антигенсвязывающий белок по настоящему изобретению и гетерологичный полипептид или пептид. В иллюстративных аспектах слитый белок по настоящему изобретению содержит переменную аминокислотную последовательность HC, слитую с переменной аминокислотной последовательностью LC, или последовательность FL HC, слитую с последовательностью FL LC. В различных аспектах слитый белок содержит пептидный линкер между переменной аминокислотной последовательностью HC и переменной аминокислотной последовательностью LC или между последовательностью FL HC и последовательностью FL LC.

[00144] *Нуклеиновые кислоты*

[00145] Настоящее изобретение дополнительно предусматривает нуклеиновые кислоты, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенсвязывающий белок, или полипептид, или слитый белок по настоящему изобретению. Термин "нуклеиновая кислота", используемый в данном документе, включает "полинуклеотид", "олигонуклеотид" и "молекулу нуклеиновой кислоты" и, как правило, означает полимер ДНК или РНК или их модифицированные формы, которые могут быть одонитевыми или двухнитевыми, синтезированными или полученными (например, выделенными и/или очищенными) из природных источников, которые могут содержать природные, неприродные или измененные нуклеотиды и которые могут содержать природную, неприродную или измененную межнуклеотидную связь, такую как фосфорамидатная связь или фосфотиоатная связь, вместо фосфодиэфирной, находящейся между нуклеотидами немодифицированного олигонуклеотида. Нуклеиновая кислота может содержать любую нуклеотидную последовательность, которая кодирует любой из антигенсвязывающих белков или полипептидов по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота не содержит каких-либо вставок, делеций, инверсий и/или замен. В других вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит одну или несколько вставок, делеций, инверсий и/или замен.

[00146] В некоторых аспектах нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению являются рекомбинантными. Используемый в данном документе термин "рекомбинантный" относится к (i) молекулам, конструируемым вне живых клеток путем соединения сегментов природной или синтетической нуклеиновой кислоты с молекулами нуклеиновой кислоты, которые могут реплицироваться в живой клетке, или (ii) молекулам, образующимся в результате репликации молекул, описанных в (i) выше. Для целей данного документа репликация может представлять собой репликацию *in vitro* или репликацию *in vivo*.

[00147] Нуклеиновые кислоты в некоторых аспектах конструируют на основе реакций химического синтеза и/или ферментативного лигирования с применением процедур, известных из уровня техники. См., например, Sambrook et al., выше; и Ausubel et al., выше. Например, нуклеиновую кислоту можно синтезировать химическим путем с использованием встречающихся в природе нуклеотидов или различным образом модифицированных нуклеотидов, разработанных для повышения биологической стабильности молекулы или для повышения физической стабильности дуплекса, образующегося при гибридизации (например, фосфотиоатных производных и акридинзамещенных нуклеотидов). Примеры модифицированных нуклеотидов, которые можно использовать для получения нуклеиновых кислот, включают без ограничения 5-фторурацил, 5-бром урацил, 5-хлорурацил, 5-йодурацил, гипоксантин, ксантин, 4-ацетилцитозин, 5-(карбоксигидроксиметил)урацил, 5-карбоксиметиламинометил-2-тиоурidin, 5-карбоксиметиламинометилурацил, дигидроурацил, бета-D-галактозилквеуозин, инозин, N⁶-изопентениладенин, 1-метилгуанин, 1-метиинозин, 2,2-диметилгуанин, 2-метиладенин, 2-метилгуанин, 3-метилцитозин, 5-метилцитозин, N-

замещенный аденин, 7-метилгуанин, 5-метиламинометилурацил, 5-метоксиаминометил-2-тиоурацил, бета-D-маннозилквеуозин, 5'-метоксикарбоксиметилурацил, 5-метоксиурацил, 2-метилтио-N⁶-изопентениладенин, урацил-5-оксиуксусную кислоту (v), вибутоксозин, псевдоурацил, квеуозин, 2-тиоцитозин, 5-метил-2-тиоурацил, 2-тиоурацил, 4-тиоурацил, 5-метилурацил, метиловый сложный эфир урацил-5-оксиуксусной кислоты, 3-(3-амино-3-N-2-карбоксипропил)урацил и 2,6-диаминопурин. В качестве альтернативы, одна или несколько нуклеиновых кислот по настоящему изобретению могут быть приобретены у компаний, таких как Macromolecular Resources (Форт-Коллинс, Колорадо) и Synthegen (Хьюстон, Техас).

[00148] В различных аспектах нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенсвязывающий белок, или полипептид, или слитый белок по настоящему изобретению. В различных аспектах нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную(аминокислотные) последовательность(последовательности), характеризующуюся(характеризующиеся) SEQ ID NO, перечисленными в таблице A1, или таблице A2, или таблице B1, или таблице B2, или таблице C1, или таблице C2. В различных аспектах нуклеотидная последовательность кодирует аминокислотную последовательность, содержащую шесть CDR из таблицы A1 или таблицы A2 с промежуточными аминокислотами. В различных аспектах нуклеотидная последовательность содержит только одну из аминокислотных последовательностей варибельной области HC или варибельной области LC из таблицы B1 или таблицы B2. В различных аспектах нуклеотидная последовательность кодирует как варибельные аминокислотные последовательности HC, так и варибельные аминокислотные последовательности LC из таблицы B1 или таблицы B2, слитые в виде одной последовательности, где необязательно аминокислотные последовательности варибельной области HC и варибельной области LC связаны друг с другом посредством линкерной последовательности. В различных примерах нуклеотидная последовательность кодирует полипептид, описанный в данном документе. В различных аспектах нуклеотидная последовательность кодирует только одну из аминокислотных последовательностей FL HC или FL LC из таблицы B1, или таблицы B2, или таблицы C1, или таблицы C2. В различных аспектах нуклеотидная последовательность кодирует аминокислотную последовательность обеих аминокислотных последовательностей FL HC и FL LC из таблицы B1, или таблицы B2, или таблицы C1, или таблицы C2, слитых в виде одной последовательности, где необязательно FL HC и FL LC связаны друг с другом посредством линкерной последовательности. В иллюстративных аспектах нуклеотидная последовательность кодирует вариантную последовательность исходной последовательности, содержащую аминокислотную последовательность из таблицы A1, или таблицы A2, или таблицы B1, или таблицы B2, или таблицы C1, или таблицы C2. В различных аспектах нуклеотидная последовательность кодирует аминокислотную последовательность, которая отличается только 1, 2, 3, 4, 5, 6 или больше аминокислотами

относительно исходной последовательности. В иллюстративных аспектах нуклеотидная последовательность кодирует вариантную последовательность, которая отличается только одной или двумя аминокислотами относительно исходной последовательности. В иллюстративных аспектах нуклеотидная последовательность кодирует вариантную последовательность, характеризующуюся только 1, 2, 3, 4, 5, 6 или больше консервативными аминокислотными заменами относительно упомянутой(упомянутых) выше аминокислотной(аминокислотных) последовательности(последовательностей). В иллюстративных аспектах нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность под любым из SEQ ID NO: 2037-2092, как показано в таблице D. В различных примерах нуклеотидная последовательность под любым из SEQ ID NO: 2037-2092 содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнальную последовательность. В различных аспектах нуклеиновая кислота по настоящему изобретению содержит нуклеотидную последовательность под любым из SEQ ID NO: 2037-2092 без нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнальную последовательность. В различных аспектах нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность под любым из SEQ ID NO: 2037-2092 без первых 60, 63, 66 или 69 нуклеиновых кислот под любым из SEQ ID NO: 2037-2092.

ТАБЛИЦА D

Название Ab	ВАРИАБЕЛЬНАЯ область LC	ВАРИАБЕЛЬНАЯ область HC
1E1	2037	2038
1E1.016	2039	2040
24F1	2041	2042
29E10	2043	2044
24F1.001	2045	2046
29E10_CONS.020	2047	2048
29E10_CONS.021	2049	2050
29E10_CONS.022	2051	2052
29E10_CONS.025	2053	2054
11E4	2055	2056
31B3	2057	2058
27G12	2059	2060
28F9	2061	2062
28H7	2063	2064
36C8	2065	2066

55G7.041.008	2067	2068
58A7.003.008.075	2069	2070
4G10	2071	2072
11A3	2073	2074
28B8	2075	2076
39D2	2077	2078
43B7	2079	2080
55G7	2081	2082
66H9	2083	2084
43B7.002.015	2085	2086
58A7.003.008	2087	2088
66H9.009	2089	2090
58A7	2091	2092

[00149] *Векторы*

[00150] В некоторых аспектах нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению включены в состав вектора. В этом отношении в настоящем изобретении предусмотрены векторы, содержащие любую из раскрытых в настоящем изобретении нуклеиновых кислот. В иллюстративных аспектах вектор представляет собой рекомбинантный вектор экспрессии. Для целей данного документа термин "рекомбинантный вектор экспрессии" означает генетически модифицированную олигонуклеотидную или полинуклеотидную конструкцию, которая обеспечивает экспрессию мРНК, белка, полипептида или пептида в клетке-хозяине, если конструкция содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую мРНК, белок, полипептид или пептид, и вектор приводят в контакт с клеткой в условиях, достаточных для экспрессии мРНК, белка, полипептида или пептида в клетке. Векторы по настоящему изобретению не являются целиком и полностью встречающимися в природе. Однако, части векторов могут быть встречающимися в природе. Раскрытые в настоящем изобретении векторы могут содержать любой тип нуклеотидов, в том числе без ограничения ДНК и РНК, которые могут быть одонитевыми или двухнитевыми, синтезированными или полученными частично из природных источников и которые могут содержать природные, неприродные или измененные нуклеотиды. Векторы могут содержать встречающиеся в природе или не встречающиеся в природе межнуклеотидные связи или оба этих типа связей. В некоторых аспектах измененные нуклеотиды или не встречающиеся в природе межнуклеотидные связи не служат помехой для транскрипции или репликации вектора.

[00151] Вектор по настоящему изобретению может представлять собой любой подходящий вектор и может применяться для трансформации или трансфекции любого подходящего хозяина. Подходящие векторы включают векторы, разработанные для

воспроизводства и размножения или для экспрессии или как для того, так и для другого, такие как плазмиды и вирусы. Вектор может быть выбран из группы, состоящей из серии pUC (Fermentas Life Sciences), серии pBluescript (Stratagene, Ла-Хойя, Калифорния), серии pET (Novagen, Мэдисон, Висконсин), серии pGEX (Pharmacia Biotech, Уппсала, Швеция) и серии pEX (Clontech, Пало-Альто, Калифорния). Также могут применяться бактериофаговые векторы, такие как λ GT10, λ GTI 1, λ ZapII (Stratagene), λ EMBL4 и λ NMI 149. Примеры векторов экспрессии в клетках растений включают pBIOI, pBI101.2, pBI101.3, pBI121 и pBIN19 (Clontech). Примеры векторов экспрессии в клетках животных включают pEUK-CI, pMAM и pMAMneo (Clontech). В некоторых аспектах вектор представляет собой вирусный вектор, например, ретровирусный вектор.

[00152] Векторы по настоящему изобретению могут быть получены с применением стандартных методик рекомбинантных ДНК, описанных, например, в Sambrook et al., выше, и Ausubel et al., выше. Конструкции векторов экспрессии, которые являются кольцевыми или линейными, могут быть получены так, чтобы они содержали систему репликации, функциональную в прокариотической или эукариотической клетке-хозяине. Системы репликации могут быть получены, например, из CoIEI, плазмиды размером 2 мкм, λ , SV40, вируса папилломы крупного рогатого скота и т. п.

[00153] В некоторых аспектах вектор содержит регуляторные последовательности, такие как кодоны инициации и терминации транскрипции и трансляции, которые являются специфичными в отношении типа хозяина (например, бактерии, гриба, растения или животного), в организм которого должен быть введен вектор, в случае необходимости и с учетом того, лежит ли в основе вектора ДНК или РНК.

[00154] Вектор может содержать один или несколько маркерных генов, которые обеспечивают возможность отбора трансформированных или трансфицированных хозяев. Маркерные гены включают гены, отвечающие за устойчивость к биоцидам, например, устойчивость к антибиотикам, тяжелым металлам и т. д., комплементацию у ауксотрофного хозяина для обеспечения прототрофности и т. п. Подходящие маркерные гены для раскрытых в настоящем изобретении векторов экспрессии включают, например, гены устойчивости к неомицину/G418, гены устойчивости к гигромицину, гены устойчивости к гистидинолу, гены устойчивости к тетрациклину и гены устойчивости к ампициллину.

[00155] Вектор может содержать нативный или нормативный промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей полипептид (в том числе его функциональные части и функциональные варианты), или с нуклеотидной последовательностью, которая является комплементарной нуклеотидной последовательности, кодирующей антигенсвязывающий белок, или гибридизуется с ней. Выбор промоторов, например, сильных, слабых, индуцируемых, тканеспецифичных и специфичных для стадии развития, находится в пределах компетенции среднего специалиста в данной области. Аналогично, объединение нуклеотидной последовательности с промотором также находится в пределах компетенции специалиста

в данной области. Промотор может представлять собой невирусный промотор или вирусный промотор, например, промотор цитомегаловируса (CMV), промотор SV40, промотор RSV и промотор, находящийся в длинном концевом повторе вируса стволовых клеток мышей.

[00156] В некоторых вариантах осуществления вектор кодирует легкую цепь антитела, тяжелую цепь антитела или легкую цепь и тяжелую цепь антитела. Вектор, кодирующий легкую цепь антитела, может быть применен для получения антитела по настоящему изобретению при экспрессии в клетке, которая дополнительно содержит вектор, кодирующий тяжелую цепь антитела. Сходным образом, вектор, кодирующий тяжелую цепь антитела, может быть применен для получения антитела по настоящему изобретению при экспрессии в клетке, которая дополнительно содержит вектор, кодирующий легкую цепь антитела. Таким образом, хотя как легкая цепь, так и тяжелая цепь могут кодироваться одним вектором, в определенных вариантах осуществления вектор кодирует легкую цепь, но не кодирует тяжелую цепь. В другом варианте осуществления вектор кодирует тяжелую цепь, но не кодирует легкую цепь.

[00157] В различных аспектах вектор по настоящему изобретению содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область HC или полноразмерную HC, и нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область LC или полноразмерную LC. В альтернативных аспектах вектор по настоящему изобретению содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область HC или полноразмерную HC, описанную в таблице B1, C1, B2 или C2, или нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область LC или полноразмерную LC, описанную в таблице B1, C1, B2 или C2.

[00158] *Клетки-хозяева*

[00159] В данном документе предусмотрены клетки-хозяева, содержащие одну или несколько нуклеиновых кислот или векторов по настоящему изобретению. Используемый в данном документе термин "клетка-хозяин" относится к любому типу клетки, которая может содержать раскрытый в настоящем изобретении вектор или векторы и способна к продуцированию продукта экспрессии, кодируемого нуклеиновой(нуклеиновыми) кислотой(кислотами) (например, мРНК, белка). Клетка-хозяин в некоторых аспектах представляет собой адгезивную клетку или суспендированную клетку, т. е. клетку, которая растет в суспензии. Клетка-хозяин в иллюстративных аспектах представляет собой культивируемую клетку или первичную клетку, т. е. выделенную непосредственно из организма. Клетка-хозяин может относиться к любому типу клеток, может происходить из любого типа ткани и может находиться на любой стадии развития.

[00160] В иллюстративных аспектах клетка представляет собой эукариотическую клетку, в том числе без ограничения клетку дрожжей, клетку нитчатого гриба, клетку простейшего, клетку водоросли, клетку насекомого или клетку млекопитающего. Такие клетки-хозяева описаны в уровне техники. См., например, Frenzel, et al., Front Immunol 4: 217 (2013). В иллюстративных аспектах эукариотические клетки представляют собой

клетки млекопитающих. В иллюстративных аспектах клетки млекопитающих представляют собой клетки млекопитающих, отличных от человека. В некоторых аспектах клетки представляют собой клетки яичника китайского хомячка (CHO) и их производные (например, CHO-K1, CHO pro-3, CS9), клетки миеломы мыши (например, NS0, GS-NS0, Sp2/0), клетки, сконструированные с дефицитом активности дигидрофолатредуктазы (DHFR) (например, DUKX-X11, DG44), клетки эмбриональной почки человека 293 (HEK293) или их производные (например, HEK293T, HEK293-EBNA), клетки почки африканской зеленой мартышки (например, клетки COS, клетки VERO), раковые клетки шейки матки человека (например, HeLa), эпителиальные клетки остеосаркомы кости человека U2-OS, базальные клетки альвеолярного эпителия аденокарциномы человека A549, клетки фибросаркомы человека HT1080, клетки опухоли головного мозга мыши CAD, клетки эмбриональной карциномы P19, эмбриональные фибробластные клетки мыши NIH 3T3, *фибробластные* клетки мыши L929, клетки нейробластомы мыши N2a, раковые клетки молочной железы человека MCF-7, клетки ретинобластомы Y79, клетки ретинобластомы человека SO-Rb50, раковые клетки печени человека Hep G2, клетки В-клеточной миеломы мыши J558L или клетки почки новорожденного хомяка (BHK) (Gaillet et al. 2007; Khan, Adv Pharm Bull 3(2): 257-263 (2013)). В конкретном варианте осуществления клетка-хозяин представляет собой CS9 (линия клеток CHO).

[00161] В некоторых аспектах для целей амплификации или репликации вектора клетка-хозяин представляет собой прокариотическую клетку, например, бактериальную клетку.

[00162] Также в настоящем изобретении предусмотрена популяция клеток, содержащая по меньшей мере одну клетку-хозяина, описанную в данном документе. Популяция клеток в некоторых аспектах представляет собой неоднородную популяцию, содержащую клетку-хозяина, которая содержит описанные векторы, в дополнение к по меньшей мере одной другой клетке, которая не содержит какого-либо вектора. В качестве альтернативы, в некоторых аспектах популяция клеток представляет собой по сути однородную популяцию, в случае с которой популяция содержит главным образом клетки-хозяева (например, по существу состоит из них), содержащие вектор. Популяция в некоторых аспектах представляет собой клональную популяцию клеток, в которой все клетки популяции являются клонами одной клетки-хозяина, содержащей вектор, так что все клетки популяции содержат вектор. В иллюстративных вариантах осуществления настоящего изобретения популяция клеток представляет собой клональную популяцию, содержащую клетки-хозяева, которые содержат вектор, описанный в данном документе.

[00163] В различных аспектах настоящего изобретения клетки-хозяева содержат первый вектор, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область HC или полноразмерную HC, описанную в таблице B1, C1, B2 или C2, и второй вектор, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область LC или полноразмерную LC, описанную в таблице B1, C1, B2 или

C2.

[00164] *Фармацевтические композиции*

[00165] В данном документе предусмотрены композиции, содержащие антигенсвязывающий белок (например, TIGIT-связывающий белок, CD112R-связывающий белок), полипептид, нуклеиновую кислоту, вектор, клетку-хозяина, конъюгат, слитый белок по настоящему изобретению или их комбинацию. Композиции в некоторых аспектах содержат антигенсвязывающий белок, полипептид, конъюгат, слитый белок, нуклеиновую кислоту, вектор или клетку-хозяина по настоящему изобретению или их комбинацию в выделенной и/или очищенной форме. В некоторых аспектах композиция содержит один тип (например, структуру) связывающего белка, полипептида, конъюгата, слитого белка, нуклеиновой кислоты, вектора или клетки-хозяина по настоящему изобретению или содержит комбинацию двух или более различных типов (например, различных структур) антигенсвязывающего белка, полипептида, конъюгата, слитого белка, нуклеиновой кислоты, вектора или клетки-хозяина по настоящему изобретению.

[00166] В иллюстративных аспектах композиция содержит средства, которые усиливают физико-химические свойства антигенсвязывающего белка, полипептида, конъюгата, слитого белка, нуклеиновой кислоты, вектора или клетки-хозяина, например, посредством стабилизации, например, при определенных температурах (например, комнатной температуре), увеличения срока годности, снижения деградации, например, деградации, опосредованной окисляющими протеазами, увеличения периода полужизни антигенсвязывающего белка и т. п. В некоторых аспектах композиция содержит любое из средств, раскрытых в данном документе, в виде гетерологичного фрагмента или конъюгированного фрагмента, необязательно в смеси с антигенсвязывающим белком или полипептидом по настоящему изобретению.

[00167] В иллюстративных аспектах настоящего изобретения композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель, разбавители или наполнитель. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки, полипептиды, конъюгаты, слитые белки, нуклеиновые кислоты, векторы или клетки-хозяева, раскрытые в настоящем изобретении (далее в данном документе называемые "активными средствами"), составлены в виде фармацевтической композиции, содержащей активное средство наряду с фармацевтически приемлемым носителем, разбавителем или вспомогательным веществом. В связи с этим настоящее изобретение дополнительно предусматривает фармацевтические композиции, содержащие активное средство, при этом фармацевтическая композиция предназначена для введения субъекту, например, млекопитающему.

[00168] В некоторых вариантах осуществления активное средство присутствует в фармацевтической композиции при уровне чистоты, подходящем для введения пациенту. В некоторых вариантах осуществления активное средство характеризуется уровнем чистоты, составляющим по меньшей мере приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%,

приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99%, с фармацевтически приемлемым разбавителем, носителем или наполнителем. В некоторых вариантах осуществления композиции содержат активное средство в концентрации от приблизительно 0,001 до приблизительно 30,0 мг/мл.

[00169] В иллюстративных аспектах фармацевтические композиции содержат фармацевтически приемлемый носитель. Используемый в данном документе термин "фармацевтически приемлемый носитель" включает любой из стандартных фармацевтических носителей, таких как фосфатно-солевой буферный раствор, вода, эмульсии, такие как эмульсия типа "масло в воде" или "вода в масле", и различные типы смачивающих средств. Термин также охватывает любое средство, одобренное регуляторным органом федерального правительства США или упомянутое в Фармакопее США для применения у животных, в том числе у людей.

[00170] Фармацевтическая композиция может содержать любые фармацевтически приемлемые ингредиенты, в том числе, например, подкисляющие средства, добавки, адсорбенты, аэрозольные пропелленты, средства для вытеснения воздуха, подщелачивающие средства, противослеживающие средства, антикоагулянты, противомикробные консерванты, антиоксиданты, антисептики, основания, связующие средства, буферные средства, хелатообразующие средства, средства для нанесения покрытий, окрашивающие средства, высушивающие средства, детергенты, разбавители, дезинфицирующие средства, разрыхлители, диспергирующие средства, средства для усиления растворения, красители, смягчающие средства, эмульгирующие средства, стабилизаторы эмульсий, наполнители, пленкообразующие средства, усилители вкуса и запаха, ароматизирующие средства, средства, препятствующие слеживанию и комкованию, гелеобразующие средства, гранулирующие средства, увлажняющие средства, смазывающие вещества, мукоадгезивные средства, основы для мазей, мази, маслянистые среды, органические основания, основы для пастилок, пигменты, пластификаторы, полирующие средства, консерванты, секвестранты, средства, способствующие проникновению через кожу, солюбилизующие средства, растворители, стабилизаторы, основы для суппозитория, поверхностно-активные средства, поверхностно-активные вещества, суспендирующие средства, подсластители, терапевтические средства, загустители, средства, регулирующие тоничность, противотоксические средства, средства, повышающие вязкость, водопоглощающие вещества, совместные растворители, смешивающиеся с водой, водосмягчающие вещества или смачивающие средства. См., например, Handbook of Pharmaceutical Excipients, Third Edition, A. H. Kibbe (Pharmaceutical Press, London, UK, 2000), которая включена посредством ссылки во всей своей полноте. Remington's Pharmaceutical Sciences, Sixteenth Edition, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980), которая включена посредством ссылки во всей своей полноте.

[00171] В иллюстративных аспектах фармацевтическая композиция содержит материалы для составления, которые являются нетоксичными для получающих их

пациентов в используемых дозах и концентрациях. В конкретных вариантах осуществления фармацевтические композиции содержат активное средство и одно или несколько из фармацевтически приемлемых солей; полиолов; поверхностно-активных веществ; средств, регулирующих осмотический баланс; средств, регулирующих тоничность; антиоксидантов; антибиотиков; противогрибковых средств; объемообразующих средств; лиопротекторов; пеногасителей; хелатообразующих средств; консервантов; окрашивающих средств; обезболивающих средств или дополнительных фармацевтических средств. В иллюстративных аспектах фармацевтическая композиция содержит один или несколько полиолов и/или одно или несколько поверхностно-активных веществ, необязательно в дополнение к одному или нескольким наполнителям, в том числе без ограничения фармацевтически приемлемым солям; средствам, регулирующим осмотический баланс (средствам, регулирующим тоничность); антиоксидантам; антибиотикам; противогрибковым средствам; объемообразующим средствам; лиопротекторам; пеногасителям; хелатообразующим средствам; консервантам; красящим веществам и обезболивающим средствам.

[00172] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может содержать материалы для составления, предназначенные для модификации, поддержания или сохранения, например, pH, осмолярности, вязкости, прозрачности, цвета, изотоничности, запаха, стерильности, стабильности, скорости растворения или высвобождения, адсорбции или проникающей способности композиции. В таких вариантах осуществления подходящие материалы для составления включают без ограничения аминокислоты (такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин); противомикробные средства; антиоксиданты (такие как аскорбиновая кислота, сульфит натрия или гидросульфит натрия); буферы (такие как боратный, бикарбонатный, Tris-HCl, цитратные, фосфатные буферы или буферы на основе других органических кислот); объемообразующие средства (такие как маннит или глицин); хелатирующие средства (такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA)); комплексообразующие средства (такие как кофеин, поливинилпирролидон, бета-циклодекстрин или гидроксипропил-бета-циклодекстрин); наполнители; моносахариды; дисахариды и другие углеводы (такие как глюкоза, манноза или декстрины); белки (такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины); окрашивающие, ароматизирующие и разбавляющие средства; эмульгирующие средства, гидрофильные полимеры (такие как поливинилпирролидон); низкомолекулярные полипептиды; солеобразующие противоионы (такие как натрий); консерванты (такие как хлорид бензалкония, бензойная кислота, салициловая кислота, тимеросал, фенетиловый спирт, метилпарабен, пропилпарабен, хлоргексидин, сорбиновая кислота или пероксид водорода); растворители (такие как глицерин, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль); сахарные спирты (такие как маннит или сорбит); суспендирующие средства; поверхностно-активные вещества или смачивающие средства (такие как плуроники, PEG, сорбитановые сложные эфиры, полисорбаты, такие как полисорбат 20, полисорбат, triton, трометамин, лецитин, холестерин, тилоксапол); средства, усиливающие

стабильность; средства, усиливающие тоничность (такие как галогениды щелочных металлов, предпочтительно хлорид натрия или калия, маннит, сорбит); среды-носители для доставки; разбавители; вспомогательные вещества и/или фармацевтические вспомогательные средства. См. REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition, (A. R. Gennaro, ed.), 1990, Mack Publishing Company.

[00173] Фармацевтические композиции можно составлять так, чтобы достичь физиологически совместимого значения pH. В некоторых вариантах осуществления значение pH фармацевтической композиции может составлять, например, от приблизительно 4 или приблизительно 5 до приблизительно 8,0, или от приблизительно 4,5 до приблизительно 7,5, или от приблизительно 5,0 до приблизительно 7,5.

[00174] *Пути введения*

[00175] Что касается настоящего изобретения, активное средство или фармацевтическую композицию, содержащую его, можно вводить субъекту посредством любого подходящего пути введения. Например, активное средство можно вводить субъекту посредством парентерального, назального, перорального, легочного, местного, вагинального или ректального введения. Следующее обсуждение путей введения предусмотрено лишь для демонстрации иллюстративных вариантов осуществления и не должно быть истолковано как ограничивающее объем каким-либо образом.

[00176] Составы, подходящие для парентерального введения, включают водные и неводные изотонические стерильные инъекционные растворы, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатические вещества, и растворы, которые делают состав изотоническим по отношению к крови предполагаемого пациента, получающего его, а также водные и неводные стерильные суспензии, которые могут содержать суспендирующие средства, солюбилизаторы, загустители, стабилизаторы и консерванты. Термин "парентеральный" означает вводимый посредством не пищеварительного канала, а какого-либо другого пути, такого как подкожный, внутримышечный, интраспинальный или внутривенный. Активное средство по настоящему изобретению можно вводить с физиологически приемлемым разбавителем в фармацевтическом носителе, таком как стерильная жидкость или смесь жидкостей, которые включают воду, солевой раствор, водные растворы декстрозы и родственных сахаров, спирт, такой как этанол или гексадециловый спирт, гликоль, такой как пропиленгликоль или полиэтиленгликоль, диметилсульфоксид, глицерин, кетали, такие как 2,2-диметил-153-диоксолан-4-метанол, эфиры, поли(этиленгликоль) 400, масла, жирные кислоты, сложные эфиры или глицериды жирных кислот или ацетилированные глицериды жирных кислот, с добавлением или без добавления фармацевтически приемлемого поверхностно-активного вещества, такого как мыло или детергент, суспендирующего средства, такого как пектин, карбомеры, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза или карбоксиметилцеллюлоза, или эмульгирующих средств и других фармацевтических вспомогательных средств.

[00177] Масла, которые можно применять в составах для парентерального введения, включают нефтяные, животные, растительные или синтетические масла.

Конкретные примеры масел включают арахисовое, соевое, кунжутное, хлопковое, кукурузное, оливковое масло, вазелин и минеральное масло. Подходящие жирные кислоты для применения в составах для парентерального введения включают олеиновую кислоту, стеариновую кислоту и изостеариновую кислоту. Этилолеат и изопропилмиристат являются примерами подходящих сложных эфиров жирных кислот.

[00178] Подходящие виды мыла для применения в составах для парентерального введения включают соли жирных кислот и щелочных металлов, аммония и триэтаноламина, и подходящие детергенты включают (а) катионные детергенты, такие как, например, диметилдиалкиламмонийгалогениды и алкилпиридинийгалогениды, (b) анионные детергенты, такие как, например, алкил-, арил- и олефинсульфонаты, алкил-, олефин-, эфир- и моноглицеридсульфаты и сульфосукцинаты, (с) неионогенные детергенты, такие как, например, оксиды аминов жирного ряда, алканоламиды жирных кислот и сополимеры полиоксиэтилена и полипропилена, (d) амфотерные детергенты, такие как, например, алкил- β -аминопропионаты и четвертичные аммониевые соли 2-алкилимидазолина, и (е) их смеси.

[00179] Составы для парентерального введения в некоторых вариантах осуществления содержат от приблизительно 0,5% до приблизительно 25% по весу активного средства по настоящему изобретению в растворе. Можно применять консерванты и буферы. С целью сведения до минимума или устранения раздражения в месте инъекции такие композиции могут содержать одно или несколько неионогенных поверхностно-активных веществ, характеризующихся гидрофильно-липофильным балансом (HLB), составляющим от приблизительно 12 до приблизительно 17. Количество поверхностно-активного вещества в таких составах будет, как правило, находиться в диапазоне от приблизительно 5% до приблизительно 15% по весу. Подходящие поверхностно-активные вещества включают сорбитановые сложные эфиры жирных кислот и полиэтиленгликоля, такие как сорбитанмоноолеат, и высокомолекулярные аддукты этиленоксида и гидрофобного основания, образованные путем конденсации пропиленоксида с пропиленгликолем. Составы для парентерального введения в некоторых аспектах представлены в однократных или многократных запечатанных контейнерах, таких как ампулы и флаконы, и могут храниться в высушенном путем сублимации (лиофилизированном) состоянии, которое требует лишь добавления стерильного жидкого наполнителя, например, воды для инъекций, непосредственно перед применением. Инъекционные растворы и суспензии для немедленного применения в некоторых аспектах получают из стерильных порошков, гранул и таблеток описанного ранее типа.

[00180] Инъекционные составы представляют собой составы в соответствии с настоящим изобретением. Требования к эффективным фармацевтическим носителям для инъекционных композиций хорошо известны средним специалистам в данной области (см., например, *Pharmaceutics and Pharmacy Practice*, J. B. Lippincott Company, Philadelphia, PA, Banker and Chalmers, eds., pages 238-250 (1982), и *ASHP Handbook on*

Injectable Drugs, Toissel, 4th ed., pages 622-630 (1986)).

[00181] *Дозы*

[00182] Считается, что активные средства по настоящему изобретению применимы в способах ингибирования биологических активностей, которые инициируются при связывании TIGIT с CD155 или CD112R с CD112, как описано в данном документе, и, таким образом, считаются применимыми в способах повышения иммунного ответа, например, иммунного ответа, опосредованного Т-клетками, и в способах лечения или предупреждения одного или нескольких заболеваний, например, рака. Для целей настоящего изобретения количество или доза вводимого активного средства должны быть достаточными для достижения эффекта, например, терапевтического или профилактического ответа, у субъекта или животного в течение разумного интервала времени. Например, доза активного средства по настоящему изобретению должна быть достаточной для лечения рака, как описано в данном документе, в течение периода времени от приблизительно 1 до 4 часов, от 1 до 4 дней или от 1 до 4 недель или дольше, например, от 5 до 20 или больше недель, начиная с момента введения. В некоторых вариантах осуществления период времени может быть даже более длинным. Доза будет определяться в соответствии с эффективностью конкретного активного средства и состоянием животного (например, человека), а также массой тела животного (например, человека), подлежащего лечению.

[00183] Из уровня техники известно множество анализов для определения вводимой дозы. Для целей данного документа анализ, который включает сравнение степени, в которой рак подвергается лечению после введения млекопитающему указанной дозы активного средства по настоящему изобретению, среди совокупностей млекопитающих, каждой совокупности которых дают отличающуюся дозу активного средства, можно применять для определения начальной дозы, которая должна быть введена млекопитающему. Степень, в которой рак подвергается лечению после введения определенной дозы, может быть представлена, например, в виде цитотоксичности активного средства или степени регрессии опухоли, достигаемой при использовании активного средства в мышинной ксенотрансплантатной модели. Способы измерения цитотоксичности антигенсвязывающих белков и способы анализа регрессии опухоли известны из уровня техники. Вкратце, для анализа регрессии опухоли *in vivo* ксенотрансплантаты опухоли могут быть получены посредством подкожной инокуляции мышей в правый бок опухолевыми клетками человека, суспендированными в PBS, pH 7,4. Опухоли можно измерить с применением цифрового штангенциркуля. Объем опухоли V (в мм^3) можно рассчитать с применением формулы $V = (\pi/6)LS^2$, где L представляет собой наибольший поверхностный диаметр, а S представляет собой наименьший поверхностный диаметр. См., например, Shi et al., ACS Nano 9(4): 3740-3752 (2015).

[00184] Доза активного средства по настоящему изобретению также будет определяться в соответствии с наличием, природой и степенью тяжести каких-либо нежелательных побочных эффектов, которые могут сопутствовать введению конкретного

активного средства по настоящему изобретению. Как правило, лечащий врач будет определять дозу активного средства по настоящему изобретению, с использованием которой он будет лечить каждого отдельного пациента, принимая во внимание множество факторов, таких как возраст, масса тела, общее состояние здоровья, рацион, пол, активное средство по настоящему изобретению, которое должно вводиться, путь введения и тяжесть состояния, лечение которого осуществляется. В качестве примера и без намерения ограничить настоящее изобретение, доза активного средства по настоящему изобретению может составлять от приблизительно 0,0001 до приблизительно 1 г/кг массы тела получающего лечение субъекта/день, от приблизительно 0,0001 до приблизительно 0,001 г/кг массы тела/день или от приблизительно 0,01 мг до приблизительно 1 г/кг массы тела/день.

[00185] *Составы с контролируемым высвобождением*

[00186] В некоторых вариантах осуществления активные средства, описанные в данном документе, могут быть модифицированы в виде депо-формы, так, чтобы способ высвобождения активного средства по настоящему изобретению в организме, в который его вводят, контролировался с точки зрения времени и местоположения в организме (см., например, патент США № 4450150). Депо-формы активных средств по настоящему изобретению могут представлять собой, например, имплантируемую композицию, содержащую активные средства и пористый или непористый материал, такой как полимер, где активное средство инкапсулировано в материале или рассредоточено в нем, и/или предусматривающую разложение непористого материала. Депо-форму затем имплантируют в желаемое местоположение в организме субъекта, и активное средство высвобождается из имплантата с предварительно определенной скоростью.

[00187] Фармацевтическая композиция, содержащая активное средство, в определенных аспектах модифицирована так, чтобы она имела любой тип профиля высвобождения *in vivo*. В некоторых аспектах фармацевтическая композиция представляет собой состав с немедленным высвобождением, контролируемым высвобождением, замедленным высвобождением, пролонгированным высвобождением, отсроченным высвобождением или двухфазным высвобождением. Способы составления пептидов для контролируемого высвобождения известны из уровня техники. См., например, Qian et al., J Pharm 374: 46-52 (2009) и публикации международных заявок на патент №№ WO 2008/130158, WO2004/033036; WO2000/032218 и WO 1999/040942.

[00188] Композиции по настоящему изобретению могут дополнительно содержать, например, мицеллы или липосомы или некоторую другую инкапсулированную форму или могут вводиться в форме с пролонгированным высвобождением для обеспечения эффекта длительного хранения и/или доставки.

[00189] *Комбинации*

[00190] В некоторых вариантах осуществления активные средства, описанные в данном документе, вводят отдельно, а в альтернативных вариантах осуществления вводят в комбинации с другим терапевтическим средством, например, другим активным

средством по настоящему изобретению другого типа (например, структуры). Соответственно, настоящее изобретение предусматривает комбинацию, содержащую первый антигенсвязывающий белок, который нацеливается на CD112R, и второй антигенсвязывающий белок, который нацеливается на TIGIT, каждый из которых представляет собой антигенсвязывающий белок в соответствии с настоящими изобретениями. В различных аспектах первый антигенсвязывающий белок представляет собой любой из 1E1, 1E1.016, 24F1, 29E10, 24F1.001, 29E10_CONS.020, 29E10_CONS.021, 29E10_CONS.022, 29E10_CONS.025, 11E4, 31B3, 27G12, 28F9, 28H7 или 36C8, как описано в таблице A1 или таблице B1. В различных аспектах второй антигенсвязывающий белок представляет собой любой из 55G7.041.008, 58A7.003.008.075, 4G10, 11A3, 28B8, 39D2, 43B7, 55G7, 66H9, 43B7.002.015, 58A7.003.08, 66H9.009 или 58A7, как описано в таблице A2 или таблице B2. В различных примерах первый антигенсвязывающий белок представляет собой 24F1, 29E10_CONS.020 или 29E10_CONS.022. В иллюстративных аспектах второй антигенсвязывающий белок представляет собой 43B7.002.015 или 66H9.009. В одном аспекте комбинация содержит 24F1 и 43B7.002.015. В другом аспекте комбинация содержит 24F1 и 66H9.009. В одном аспекте комбинация содержит 29E10_CONS.020 и 43B7.002.015. В другом аспекте комбинация содержит 29E10_CONS.020 и 66H9.009. В одном аспекте комбинация содержит 29E10_CONS.022 и 43B7.002.015. В другом аспекте комбинация содержит 29E10_CONS.022 и 66H9.009. В другом аспекте комбинация содержит 43B7.002.015 и 1E1.016, или 24F1, или 29E10. В еще одном аспекте комбинация содержит 66H9.009 и 1E1.016, или 24F1, или 29E10. В иллюстративных аспектах комбинация содержит 43B7 и 29E10, или 24F1, или 11E4.

[00191] Настоящее изобретение предусматривает комбинацию в виде композиции, например, фармацевтической композиции, в различных примерах. Соответственно, настоящее изобретение предусматривает композицию, например, фармацевтическую композицию, содержащую первый антигенсвязывающий белок и второй антигенсвязывающий белок. В различных примерах первый антигенсвязывающий белок представляет собой 24F1, 29E10_CONS.020 или 29E10_CONS.022. В иллюстративных аспектах второй антигенсвязывающий белок представляет собой 43B7.002.015 или 66H9.009. В одном аспекте композиция содержит 24F1 и 43B7.002.015. В другом аспекте композиция содержит 24F1 и 66H9.009. В одном аспекте композиция содержит 29E10_CONS.020 и 43B7.002.015. В другом аспекте композиция содержит 29E10_CONS.020 и 66H9.009. В одном аспекте композиция содержит 29E10_CONS.022 и 43B7.002.015. В другом аспекте композиция содержит 29E10_CONS.022 и 66H9.009. В другом аспекте композиция содержит 43B7.002.015 и 1E1.016, или 24F1, или 29E10. В еще одном аспекте композиция содержит 66H9.009 и 1E1.016, или 24F1, или 29E10. В иллюстративных аспектах композиция содержит 43B7 и 29E10, или 24F1, или 11E4. В иллюстративных примерах первый антигенсвязывающий белок и второй антигенсвязывающий белок присутствуют в композиции в соотношении, составляющем приблизительно 1:1.

[00192] В некоторых аспектах комбинация или композиция дополнительно содержит дополнительное активное средство, например, третий антигенсвязывающий белок. Необязательно третий антигенсвязывающий белок связывается с отрицательным регулятором иммунной системы, иммуносуппрессором или белком контрольной точки иммунного ответа, включая без ограничения CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, CEACAM-1, TIGIT, LAG3, CD112, CD112R, CD96, TIM3, BTLA, или с костимулирующим рецептором: ICOS, OX40, 41BB, CD27, GITR. В различных примерах дополнительное активное средство представляет собой белок, связывающий PD-1, например, антитело к PD-1. Примеры антител к PD-1 включают ниволумаб (BMS-936558), пембролизумаб (MK3475), BMS 936558, BMS-936559, TSR-042 (Tesaro), ePDR001 (Novartis) и пидилизумаб (CT-011). Необязательно третий антигенсвязывающий белок представляет собой любой антигенсвязывающий белок, связывающий PD-1, описанный в международной патентной заявке № PCT/US2019/013205, которая опубликована в виде WO/2019/140196, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки. В иллюстративных примерах третий антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность CDR1 HC, аминокислотную последовательность CDR2 HC, аминокислотную последовательность CDR3 HC, аминокислотную последовательность CDR LC, аминокислотную последовательность CDR2 LC и аминокислотную последовательность CDR3 LC под SEQ ID NO: 352-357 из WO/2019/140196 соответственно. В иллюстративных примерах третий антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность CDR1 HC, аминокислотную последовательность CDR2 HC, аминокислотную последовательность CDR3 HC, аминокислотную последовательность CDR LC, аминокислотную последовательность CDR2 LC и аминокислотную последовательность CDR3 LC под SEQ ID NO: 2027-2032 соответственно. В различных аспектах третий антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность вариабельной области HC и аминокислотную последовательность вариабельной области LC под SEQ ID NO: 358 и SEQ ID NO: 359 из WO/2019/140196 соответственно. В различных аспектах третий антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность вариабельной области HC и аминокислотную последовательность вариабельной области LC под SEQ ID NO: 2033 и SEQ ID NO: 2034 соответственно. В различных примерах третий антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность FL HC и аминокислотную последовательность FL LC под SEQ ID NO: 360 и SEQ ID NO: 361 из WO/2019/140196 соответственно. В различных примерах третий антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность FL HC и аминокислотную последовательность FL LC под SEQ ID NO: 2035 и SEQ ID NO: 2036 соответственно. В различных примерах третий антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность FL HC и аминокислотную последовательность FL LC под SEQ ID NO: 2093 и SEQ ID NO: 2094 соответственно. Необязательно первый антигенсвязывающий белок, второй антигенсвязывающий белок и третий антигенсвязывающий белок

присутствуют в композиции в соотношении, составляющем приблизительно 1:1:1.

[00193] В некоторых аспектах другое терапевтическое средство направлено на лечение или предупреждение рака. В некоторых вариантах осуществления другое терапевтическое средство представляет собой химиотерапевтическое средство. В некоторых вариантах осуществления другое терапевтическое средство представляет собой средство, применяемое в лучевой терапии для лечения рака. Соответственно, в некоторых аспектах активные средства, описанные в данном документе, вводят в комбинации с одним или более из координационных соединений на основе платины, ингибиторов топоизомеразы, антибиотиков, антимиотических алкалоидов и дифторнуклеозидов.

[00194] *Наборы*

[00195] Настоящее изобретение дополнительно предусматривает наборы, содержащие антигенсвязывающий белок, полипептид, конъюгат, слитый белок, нуклеиновую кислоту, вектор или клетку-хозяина по настоящему изобретению или их комбинацию. В иллюстративных аспектах набор содержит по меньшей мере один антигенсвязывающий белок, полипептид, конъюгат, слитый белок, нуклеиновую кислоту, вектор или клетку-хозяина по настоящему изобретению или их комбинацию в контейнере. В иллюстративных аспектах по меньшей мере один антигенсвязывающий белок, полипептид, конъюгат, слитый белок, нуклеиновая кислота, вектор или клетка-хозяин по настоящему изобретению предусмотрены в наборе в виде однократной дозы. Для целей данного документа "однократная доза" относится к дискретному количеству, диспергированному в подходящем носителе. В иллюстративных аспектах однократная доза представляет собой количество, достаточное для обеспечения у субъекта желаемого эффекта, например, лечения рака. В иллюстративных аспектах набор содержит несколько однократных доз, например, недельный или месячный запас однократных доз, при этом необязательно каждая из которых упакована по отдельности или иным образом отделена от других однократных доз. В некоторых вариантах осуществления компоненты набора/разовой дозы упакованы вместе с инструкцией по введению пациенту. В некоторых вариантах осуществления набор содержит одно или несколько устройств для введения пациенту, например, иглу и шприц и т. п. В некоторых аспектах по меньшей мере один антигенсвязывающий белок, полипептид, конъюгат, слитый белок, нуклеиновая кислота, вектор или клетка-хозяин по настоящему изобретению или их комбинация предварительно упакованы в готовой к применению форме, например, шприце, пакете для внутривенного введения и т. п. В иллюстративных аспектах готовая к применению форма предназначена для однократного применения. В иллюстративных аспектах набор содержит несколько готовых к применению форм для однократного применения по меньшей мере одного антигенсвязывающего белка, полипептида, конъюгата, слитого белка, нуклеиновой кислоты, вектора или клетки-хозяина по настоящему изобретению. В некоторых аспектах набор дополнительно содержит другие терапевтические или диагностические средства или фармацевтически приемлемые носители (например, растворители, буферы, разбавители и т. д.), в том числе любые из описанных в данном

документе.

[00196] В различных аспектах набор содержит более одного антигенсвязывающего белка по настоящему изобретению. В иллюстративных примерах набор содержит первый антигенсвязывающий белок, который связывается с CD112R, и второй антигенсвязывающий белок, который связывается с TIGIT. Необязательно первый антигенсвязывающий белок составляют со вторым антигенсвязывающим белком. В некоторых аспектах набор содержит композицию, содержащую первый антигенсвязывающий белок и второй антигенсвязывающий белок. В различных аспектах первый антигенсвязывающий белок упакован и/или составлен отдельно от второго антигенсвязывающего средства. В различных примерах первый антигенсвязывающий белок представляет собой любой из 1E1, 1E1.016, 24F1, 29E10, 24F1.001, 29E10_CONS.020, 29E10_CONS.021, 29E10_CONS.022, 29E10_CONS.025, 11E4, 31B3, 27G12, 28F9, 28H7 или 36C8, как описано в таблице A1 или таблице B1. В различных аспектах второй антигенсвязывающий белок представляет собой любой из 55G7.041.008, 58A7.003.008.075, 4G10, 11A3, 28B8, 39D2, 43B7, 55G7, 66H9, 43B7.002.015, 58A7.003.08, 66H9.009 или 58A7, как описано в таблице A2 или таблице B2. В различных примерах первый антигенсвязывающий белок представляет собой 24F1, 29E10_CONS.020 или 29E10_CONS.022. В иллюстративных аспектах второй антигенсвязывающий белок представляет собой 43B7.002.015 или 66H9.009. В одном аспекте набор содержит 24F1 и 43B7.002.015. В другом аспекте набор содержит 24F1 и 66H9.009. В одном аспекте набор содержит 29E10_CONS.020 и 43B7.002.015. В другом аспекте набор содержит 29E10_CONS.020 и 66H9.009. В одном аспекте набор содержит 29E10_CONS.022 и 43B7.002.015. В другом аспекте набор содержит 29E10_CONS.022 и 66H9.009. В другом аспекте набор содержит 43B7.002.015 и 1E1.016, или 24F1, или 29E10. В еще одном аспекте набор содержит 66H9.009 и 1E1.016, или 24F1, или 29E10. В иллюстративных аспектах набор содержит 43B7 и 29E10, или 24F1, или 11E4. В иллюстративных примерах первый антигенсвязывающий белок и второй антигенсвязывающий белок присутствуют в композиции в соотношении, составляющем приблизительно 1:1.

[00197] В различных примерах набор содержит дополнительное активное средство, например, третий антигенсвязывающий белок. Необязательно третий антигенсвязывающий белок связывается с отрицательным регулятором иммунной системы, иммуносупрессором или белком контрольной точки иммунного ответа, включая без ограничения CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, CEACAM-1, TIGIT, LAG3, CD112, CD112R, CD96, TIM3, BTLA, или с костимулирующим рецептором: ICOS, OX40, 41BB, CD27, GITR. В различных примерах дополнительное активное средство представляет собой белок, связывающий PD-1, например, антитело к PD-1. Примеры антител к PD-1 включают ниволумаб (BMS-936558), пембролизумаб (MK3475), BMS 936558, BMS-936559, TSR-042 (Tesaro), ePDR001 (Novartis) и пидилизумаб (CT-011). Необязательно третий антигенсвязывающий белок представляет собой любой антигенсвязывающий белок, связывающий PD-1, описанный в международной патентной

заявке № PCT/US2019/013205, которая опубликована в виде WO/2019/140196, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки. В иллюстративных примерах третий антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность CDR1 HC, аминокислотную последовательность CDR2 HC, аминокислотную последовательность CDR3 HC, аминокислотную последовательность CDR LC, аминокислотную последовательность CDR2 LC и аминокислотную последовательность CDR3 LC под SEQ ID NO: 352-357 из WO/2019/140196 соответственно. В иллюстративных примерах третий антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность CDR1 HC, аминокислотную последовательность CDR2 HC, аминокислотную последовательность CDR3 HC, аминокислотную последовательность CDR LC, аминокислотную последовательность CDR2 LC и аминокислотную последовательность CDR3 LC под SEQ ID NO: 2027-2032 соответственно. В различных аспектах третий антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность варибельной области HC и аминокислотную последовательность варибельной области LC под SEQ ID NO: 358 и SEQ ID NO: 359 из WO/2019/140196 соответственно. В различных аспектах третий антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность варибельной области HC и аминокислотную последовательность варибельной области LC под SEQ ID NO: 2033 и SEQ ID NO: 2034 соответственно. В различных примерах третий антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность FL HC и аминокислотную последовательность FL LC под SEQ ID NO: 360 и SEQ ID NO: 361 из WO/2019/140196 соответственно. В различных примерах третий антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность FL HC и аминокислотную последовательность FL LC под SEQ ID NO: 2035 и SEQ ID NO: 2036 соответственно. В различных аспектах каждый антигенсвязывающий белок упакован в набор отдельно. Необязательно набор содержит контейнер, например, флакон, шприц, пакет и т. п., содержащие по меньшей мере два из первого, второго и третьего антигенсвязывающих белков. Необязательно набор содержит все антигенсвязывающие белки в одном контейнере в виде смеси.

[00198] *Способы лечения*

[00199] Настоящее изобретение дополнительно предусматривает способы лечения. В иллюстративных вариантах осуществления способ представляет собой способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции по настоящему изобретению в количестве, эффективном для лечения субъекта.

[00200] Фармацевтические композиции по настоящему изобретению являются применимыми для ингибирования передачи сигнала TIGIT, и/или передачи сигнала CD112R, и/или передачи сигнала PD-1. Без ограничения какой-либо теорией, активность, ингибирующая TIGIT, и/или активность, ингибирующая CD112R, и/или активность, ингибирующая PD-1, композиций, предусмотренных в данном документе, позволяют делать такие структуры применимыми в способах усиления Т-клеточной активности и

повышения иммунного ответа, и, в частности, иммунного ответа против опухоли или рака.

[00201] Соответственно, в данном документе предусмотрены способы усиления Т-клеточной активности у субъекта, увеличения выживаемости и эффекторной функции Т-клеток, ограничения терминальной дифференцировки и утраты репликативного потенциала, способствования продолжительному существованию Т-клеток и усиления цитотоксичности в отношении клеток-мишеней (например, раковых клеток). В иллюстративных вариантах осуществления способы включают введение субъекту фармацевтической композиции по настоящему изобретению в эффективном количестве. В иллюстративных аспектах Т-клеточная активность или иммунный ответ направлены против раковой клетки, или раковой ткани, или опухолевой клетки, или опухоли. В иллюстративных аспектах иммунный ответ представляет собой гуморальный иммунный ответ. В иллюстративных аспектах иммунный ответ представляет собой врожденный иммунный ответ. В иллюстративных аспектах усиленный иммунный ответ представляет собой иммунный ответ, опосредованный Т-клетками.

[00202] Используемый в данном документе термин "усиливать" и слова, происходящие от него, могут не означать 100% или полное усиление или увеличение. Они скорее означают различные степени усиления, которые средний специалист в данной области признает в качестве обладающих потенциальной пользой или терапевтическим эффектом. В данном отношении фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут усиливать, например, Т-клеточную активность или усиливать иммунный ответ до любой величины или уровня. В иллюстративных вариантах осуществления усиление, предусмотренное способами по настоящему изобретению, представляет собой по меньшей мере или приблизительно 10% усиление (например, по меньшей мере или приблизительно 20% усиление, по меньшей мере или приблизительно 30% усиление, по меньшей мере или приблизительно 40% усиление, по меньшей мере или приблизительно 50% усиление, по меньшей мере или приблизительно 60% усиление, по меньшей мере или приблизительно 70% усиление, по меньшей мере или приблизительно 80% усиление, по меньшей мере или приблизительно 90% усиление, по меньшей мере или приблизительно 95% усиление, по меньшей мере или приблизительно 98% усиление).

[00203] Способы измерения Т-клеточной активности и иммунных ответов известны из уровня техники. Т-клеточную активность можно измерить с помощью, например, анализа цитотоксичности, такого как описанный в Fu et al., PLoS ONE 5(7): e11867 (2010). Другие анализы Т-клеточной активности описаны в Bergovici et al., Clin Diagn Lab Immunol. 7(6): 859-864 (2000). Способы измерения иммунных ответов описаны, например, в Macatangay et al., Clin Vaccine Immunol 17(9): 1452-1459 (2010), и Clay et al., Clin Cancer Res. 7(5):1127-35 (2001).

[00204] В данном документе также предусмотрены способы усиления активности естественных клеток-киллеров (NK) у субъекта. В иллюстративных вариантах осуществления способы включают введение субъекту фармацевтической композиции по

настоящему изобретению в эффективном количестве. В иллюстративных аспектах НК-клеточная активность направлена против раковой клетки, или раковой ткани, или опухолевой клетки, или опухоли.

[00205] Дополнительно в данном документе предусмотрены способы лечения субъекта с раком и способы лечения субъекта с солидной опухолью. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает введение субъекту фармацевтической композиции по настоящему изобретению в количестве, эффективном для лечения рака или солидной опухоли у субъекта. Рак, поддающийся лечению с помощью способов, раскрытых в данном документе, может представлять собой любую форму рака, например, любой злокачественный рост или опухоль, обусловленные аномальным и неконтролируемым делением клеток, которые могут распространяться в другие части тела посредством лимфатической системы или кровотока. В некоторых аспектах рак представляет собой рак, выбранный из группы, состоящей из острого лимфоцитарного рака, острого миелоидного лейкоза, альвеолярной рабдомиосаркомы, рака кости, рака головного мозга, рака молочной железы, рака анального отверстия, рака заднепроходного канала или аноректального рака, рака глаза, рака внутрипеченочного желчного протока, рака суставов, рака шеи, желчного пузыря или плевры, рака носа, носовой полости или среднего уха, рака ротовой полости, рака вульвы, хронического лимфоцитарного лейкоза, хронического миелоидного рака, рака толстой кишки, рака пищевода, рака шейки матки, карциноидной опухоли желудочно-кишечного тракта, лимфомы Ходжкина, рака гортанной части глотки, рака почки, рака гортани, рака печени, рака легкого, злокачественной мезотелиомы, меланомы, множественной миеломы, рака носоглотки, неходжкинской лимфомы, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака брюшины, сальника и брыжейки, рака глотки, рака предстательной железы, рака прямой кишки, рака почки (например, почечноклеточной карциномы (RCC)), рака тонкой кишки, рака мягких тканей, рака желудка, рака яичка, рака щитовидной железы, рака мочеочника и рака мочевого пузыря. В конкретных аспектах рак выбран из группы, состоящей из форм рака головы и шеи, яичника, шейки матки, мочевого пузыря и пищевода, рака поджелудочной железы, желудочно-кишечного тракта, форм рака желудка, молочной железы, эндометрия и колоректального рака, гепатоцеллюлярной карциномы, глиобластомы, рака мочевого пузыря, рака легкого, например, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), бронхиолоальвеолярной карциномы. В конкретных вариантах осуществления опухоль представляет собой немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), рак головы и шеи, рак почки, трижды негативный рак молочной железы и рак желудка. В иллюстративных аспектах субъект имеет опухоль (например, солидную опухоль, гемобластоз или лимфолейкоз), и фармацевтическую композицию вводят субъекту в количестве, эффективном для лечения опухоли у субъекта. В других иллюстративных аспектах опухоль представляет собой немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), мелкоклеточный рак легкого (SCLC), рак головы и шеи, рак почки, рак молочной железы, меланому, рак яичника, рак печени, рак поджелудочной железы, рак толстой кишки, рак предстательной

железы, рак желудка, лимфому или лейкоз, и фармацевтическую композицию вводят субъекту в количестве, эффективном для лечения опухоли у субъекта.

[00206] Используемый в данном документе термин "лечить", а также слова, родственные ему, не обязательно подразумевают 100% или полное лечение. Они скорее означают различные степени лечения, которые средний специалист в данной области признает в качестве обладающих потенциальной пользой или терапевтическим эффектом. В данном отношении способы лечения рака по настоящему изобретению могут обеспечивать любую величину или любой уровень лечения. Кроме того, лечение, предусмотренное способом по настоящему изобретению, может включать лечение одного или нескольких состояний или симптомов или признаков рака, подвергаемого лечению. Также лечение, предусмотренное способами по настоящему изобретению, может охватывать замедление прогрессирования рака. Например, способы могут предусматривать лечение рака благодаря усилению Т-клеточной активности, или НК-клеточной активности, или иммунного ответа против рака, снижению скорости роста опухоли или рака, снижению метастазирования опухолевых клеток, повышению гибели опухолевых или раковых клеток и т. п. В иллюстративных аспектах способы обеспечивают лечение посредством задержки начала проявления или рецидива рака на 1 день, 2 дня, 4 дня, 6 дней, 8 дней, 10 дней, 15 дней, 30 дней, два месяца, 4 месяцев, 6 месяцев, 1 год, 2 года, 4 года или больше. В иллюстративных аспектах способы обеспечивают лечение посредством увеличения выживаемости субъекта.

[00207] *Субъекты*

[00208] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения субъект является млекопитающим, включающим без ограничения млекопитающих из отряда Rodentia, таких как мыши и хомяки, и млекопитающих из отряда Lagomorpha, таких как кролики, млекопитающих из отряда Carnivora, в том числе кошачьих (кошек) и псовых (собак), млекопитающих из отряда Artiodactyla, в том числе бычьих (коров) и свинных (свиней), или отряда Perissodactyla, в том числе лошадиных (лошадей). В некоторых аспектах млекопитающие относятся к отряду Приматы, Цепкохвостые обезьяны или Обезьянообразные (нечеловекообразные обезьяны) или к отряду Человекообразные (люди и человекообразные обезьяны). В некоторых аспектах млекопитающее является человеком.

[00209] *Способы изготовления*

[00210] Антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению можно получать посредством способов, известных из уровня техники. Подходящие способы синтеза полипептидов de novo описаны, например, в Chan et al., Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2005; Peptide and Protein Drug Analysis, ed. Reid, R., Marcel Dekker, Inc., 2000; Epitope Mapping, ed. Westwood et al., Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2000; и патенте США № 5449752. Дополнительные иллюстративные способы получения пептидов по настоящему изобретению изложены в данном документе.

[00211] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки, описанные в данном документе, коммерчески синтезируются такими компаниями, как Synper (Дублин, Калифорния), Peptide Technologies Corp. (Гейтерсберг, Мэриленд), Multiple Peptide Systems (Сан-Диего, Калифорния), Peptide 2.0 Inc. (Шантильи, Вирджиния) и American Peptide Co. (Саннивейл, Калифорния). В этом отношении антигенсвязывающие белки могут быть синтетическими, рекомбинантными, выделенными и/или очищенными.

[00212] Также в некоторых аспектах антигенсвязывающие белки получают рекомбинантным путем с использованием нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность пептида, с применением стандартных рекомбинантных способов. См., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY 2001; и Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, NY, 1994.

[00213] В данном документе дополнительно предусмотрены способы получения раскрытых в настоящем изобретении антигенсвязывающих белков. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает культивирование раскрытой в настоящем изобретении клетки-хозяина в целях обеспечения экспрессии антигенсвязывающего белка и сбора экспрессируемого антигенсвязывающего белка. Клетка-хозяин может представлять собой любую из клеток-хозяев, описанных в данном документе. В иллюстративных аспектах клетка-хозяин выбрана из группы, состоящей из клеток СНО, клеток NS0, клеток COS, клеток VERO и клеток ВНК. В иллюстративных аспектах стадия культивирования клетки-хозяина включает культивирование клетки-хозяина в среде для роста для поддержания роста и размножения клетки-хозяина. В иллюстративных аспектах среда для роста обеспечивает своевременное увеличение плотности клеток, жизнеспособности и продуктивности культуры. В иллюстративных аспектах среда для роста содержит аминокислоты, витамины, неорганические соли, глюкозу и сыворотку крови в качестве источника факторов роста, гормонов и факторов прикрепления. В иллюстративных аспектах среда для роста представляет собой среду с полностью химически определенным составом, состоящую из аминокислот, витаминов, следовых элементов, неорганических солей, липидов и инсулина или инсулиноподобных факторов роста. В дополнение к питательным веществам, среда для роста также способствует поддержанию pH и осмоляльности. Несколько сред для роста являются коммерчески доступными и описаны в уровне техники. См., например, Arora, "Cell Culture Media: A Review" *MATER METHODS* 3:175 (2013).

[00214] В иллюстративных аспектах способ получения антигенсвязывающего белка по настоящему изобретению включает культивирование клетки-хозяина в питательной среде. В иллюстративных аспектах способ включает культивирование в питательной среде в периодическом режиме с подпиткой. Способы получения рекомбинантных белков известны из уровня техники. См., например, Li et al., "Cell culture processes for monoclonal

antibody production" MAbs 2(5): 466-477 (2010).

[00215] Способ получения антигенсвязывающего белка может включать одну или несколько стадий очистки белка из культуры клеток или ее надосадочной жидкости и предпочтительно извлечение очищенного белка. В иллюстративных аспектах способ включает одну или несколько стадий осуществления хроматографии, например, аффинной хроматографии (например, аффинной хроматографии с белком А), ионообменной хроматографии, хроматографии гидрофобных взаимодействий. В иллюстративных аспектах способ включает очистку белка с помощью смолы для аффинной хроматографии с белком А.

[00216] В иллюстративных вариантах осуществления способ дополнительно включает стадии составления очищенного белка и т. д. с получением таким образом состава, содержащего очищенный белок. Такие стадии описаны в Formulation and Process Development Strategies for Manufacturing, eds. Jameel and Hershenson, John Wiley & Sons, Inc. (Hoboken, NJ), 2010.

[00217] *Иллюстративные варианты осуществления*

[00218] Ниже приведен перечень иллюстративных вариантов осуществления настоящего изобретения.

1. Антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, необязательно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий (a) аминокислотную последовательность определяющей комплементарности области (CDR) 1 тяжелой цепи (HC), представленную в таблице A1, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности; (b) аминокислотную последовательность CDR2 HC, представленную в таблице A1, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности; (c) аминокислотную последовательность CDR3 HC, представленную в таблице A1, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности; (d) аминокислотную последовательность CDR1 легкой цепи (LC), представленную в таблице A1, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности; (e) аминокислотную последовательность CDR2 LC, представленную в таблице A1, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности; (f) аминокислотную последовательность CDR3 LC, представленную в таблице A1, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности, или (g) комбинацию любых двух или больше из (a)-

(f).

2. Антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, по варианту осуществления 1, содержащий шесть аминокислотных последовательностей CDR, перечисленных в одной строке таблицы A1, или содержащий шесть аминокислотных последовательностей CDR, выбранных из группы, состоящей из: (a) SEQ ID NO: 13-18; (b) SEQ ID NO: 23-28; (c) SEQ ID NO: 33-38; (d) SEQ ID NO: 43-48; (e) SEQ ID NO: 53-58; (f) SEQ ID NO: 63-68; (g) SEQ ID NO: 73-78; (h) SEQ ID NO: 83-88, (i) SEQ ID NO: 93-98, (j) SEQ ID NO: 103-108, (k) SEQ ID NO: 233-238, (l) SEQ ID NO: 1973-1978, (m) SEQ ID NO: 1983-1988, (n) SEQ ID NO: 1993-1998 и (o) SEQ ID NO: 2003-2008.

3. Антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, по варианту осуществления 1 или 2, содержащий (a) аминокислотную последовательность вариабельной области HC, представленную в таблице B1, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-15 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% или приблизительно 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью вариабельной области HC из таблицы B1; (b) аминокислотную последовательность вариабельной области LC, представленную в таблице B1, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-15 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% или приблизительно 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью вариабельной области LC из таблицы B1, или (c) комбинацию (a) и (b).

4. Антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, по варианту осуществления 3, содержащий пару аминокислотных последовательностей вариабельной области HC и вариабельной области LC, перечисленных в одной строке таблицы B1, или содержащий пару аминокислотных последовательностей, выбранную из группы, состоящей из: (a) SEQ ID NO: 11-12; (b) SEQ ID NO: 21-22; (c) SEQ ID NO: 31-32; (d) SEQ ID NO: 41-42; (e) SEQ ID NO: 51-52; (f) SEQ ID NO: 61-62; (g) SEQ ID NO: 71-72; (h) SEQ ID NO: 81-82, (i) SEQ ID NO: 91-92, (j) SEQ ID NO: 101-102, (k) SEQ ID NO: 231-232, (l) SEQ ID NO: 1971-1972, (m) SEQ ID NO: 1981-1982, (n) SEQ ID NO: 1991-1992 и (o) SEQ ID NO: 2001-2002.

5. Антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, по любому из предыдущих вариантов осуществления, содержащий (a) аминокислотную последовательность полноразмерной (FL) HC, представленную в таблице B1, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-50 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% или приблизительно 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью FL HC из таблицы B1; (b) аминокислотную последовательность FL LC, представленную в таблице B1, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-50 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% или приблизительно 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью FL LC из таблицы B1, или (c) комбинацию (a) и (b).

6. Антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, по варианту осуществления 5, содержащий пару аминокислотных последовательностей полноразмерной (FL) HC и FL LC, перечисленных в одной строке таблицы В, или содержащий пару аминокислотных последовательностей, выбранную из группы, состоящей из: (a) SEQ ID NO: 9-10; (b) SEQ ID NO: 19-20; (c) SEQ ID NO: 29-30; (d) SEQ ID NO: 39-40; (e) SEQ ID NO: 49-50; (f) SEQ ID NO: 59-60; (g) SEQ ID NO: 69-70; (h) SEQ ID NO: 79-80, (i) SEQ ID NO: 89-90, (j) SEQ ID NO: 99-100, (k) SEQ ID NO: 229-230, (l) SEQ ID NO: 1969-1970, (m) SEQ ID NO: 1979-1980, (n) SEQ ID NO: 1989-1990 и (o) SEQ ID NO: 1999-2000.

7. Антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, по любому из предыдущих вариантов осуществления, который представляет собой антитело.

8. Антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, по пункту 7, содержащий: аминокислотную последовательность определяющей комплементарность области (CDR) 1 тяжелой цепи (HC) под SEQ ID NO: 33 или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности; (b) аминокислотную последовательность CDR2 HC под SEQ ID NO: 34 или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности; (c) аминокислотную последовательность CDR3 HC под SEQ ID NO: 35 или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности; (d) аминокислотную последовательность CDR1 легкой цепи (LC) под SEQ ID NO: 36 или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности; (e) аминокислотную последовательность CDR2 LC под SEQ ID NO: 37 или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности; (f) аминокислотную последовательность CDR3 LC под SEQ ID NO: 38 или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности, или

аминокислотную последовательность определяющей комплементарность области (CDR) 1 тяжелой цепи (HC) под SEQ ID NO: 63 или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности; (b) аминокислотную последовательность CDR2 HC под SEQ ID NO: 64 или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности; (c) аминокислотную последовательность CDR3 HC под SEQ ID NO: 65 или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей

или (с) комбинацию (а) и (b), или

(а) аминокислотную последовательность полноразмерной (FL) НС под SEQ ID NO: 79 или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-50 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% или приблизительно 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью FL НС под SEQ ID NO: 79; (b) аминокислотную последовательность FL LC, представленную под SEQ ID NO: 80, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-50 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% или приблизительно 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью FL LC под SEQ ID NO: 80, или (с) комбинацию (а) и (b).

9. Антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, по любому из предыдущих вариантов осуществления, который представляет собой антигенсвязывающий фрагмент антитела.

10. Антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, по любому предыдущих вариантов осуществления, который представляет собой белковый продукт на основе антитела, необязательно scFv.

11. Полипептид, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO из таблицы A1, B1 или C1, или ее вариантную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% или приблизительно 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO из таблицы, или их комбинацию.

12. Конъюгат, содержащий антигенсвязывающий белок или полипептид, связывающий CD112R, по любому из предыдущих вариантов осуществления и гетерологичный фрагмент.

13. Конъюгат по варианту осуществления 12, содержащий аминокислотную последовательность антигенсвязывающего белка или полипептида, слитую с другой аминокислотной последовательностью.

14. Нуклеиновая кислота, кодирующая антигенсвязывающий белок или полипептид, связывающий CD112R, или конъюгат по любому из предыдущих вариантов осуществления.

15. Нуклеиновая кислота, кодирующая легкую цепь, тяжелую цепь или как легкую цепь, так и тяжелую цепь антитела по варианту осуществления 9 или 10.

16. Нуклеиновая кислота по варианту осуществления 14 или 15, где нуклеотидная последовательность кодирует (а) аминокислотную последовательность вариабельной области НС, представленную в таблице B1, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-15 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% или приблизительно 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью вариабельной области НС из таблицы B1; (b) аминокислотную последовательность вариабельной области LC,

представленную в таблице B1, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-15 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% или приблизительно 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью вариабельной области LC из таблицы B1, или (с) обе из (а) и (b).

17. Вектор, содержащий одну или несколько нуклеиновых кислот по любому из вариантов осуществления 14-16.

18. Клетка-хозяин, содержащая одну или несколько нуклеиновых кислот по любому из вариантов осуществления 14-16 или один или несколько векторов по варианту осуществления 17.

19. Клетка-хозяин по варианту осуществления 18, где клетка-хозяин продуцирует антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, по любому из вариантов осуществления 1-10.

20. Антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, необязательно антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий (а) аминокислотную последовательность определяющей комплементарности области (CDR) 1 тяжелой цепи (HC), представленную в таблице A2, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности; (b) аминокислотную последовательность CDR2 HC, представленную в таблице A2, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности; (с) аминокислотную последовательность CDR3 HC, представленную в таблице A2, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности; (d) аминокислотную последовательность CDR1 легкой цепи (LC), представленную в таблице A2, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности; (е) аминокислотную последовательность CDR2 LC, представленную в таблице A2, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности; (f) аминокислотную последовательность CDR3 LC, представленную в таблице A2, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности, или (g) комбинацию любых двух или больше из (а)-(f).

21. Антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, по варианту осуществления 20, содержащий:

аминокислотную последовательность CDR1 LC, содержащую **Gln27** или его

консервативную аминокислотную замену, **Ser28** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию; аминокислотную последовательность CDR2 LC, содержащую **Glu1** или ее консервативную аминокислотную замену; аминокислотную последовательность CDR3 LC, содержащую **Ser91** или его консервативную аминокислотную замену, **Ser92** или его консервативную аминокислотную замену, **Ser93** или его консервативную аминокислотную замену, **Leu94** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию; аминокислотную последовательность CDR1 HC, содержащую **Val32** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr33** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию; аминокислотную последовательность CDR2 HC, содержащую **Tyr52** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr54** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr55** или его консервативную аминокислотную замену, **Ser56** или его консервативную аминокислотную замену, **Gly57** или его консервативную аминокислотную замену, **Gly58** или его консервативную аминокислотную замену, **Thr59** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr60** или его консервативную аминокислотную замену, **Pro63** или его консервативную аминокислотную замену, **Arg66** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию, и аминокислотную последовательность CDR3 HC, содержащую **Ile102** или его консервативную аминокислотную замену, **Ala104** или его консервативную аминокислотную замену, **Gly107** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr108** или его консервативную аминокислотную замену, **Phe109** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr110** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr111** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию; где номер положения указан относительно аминокислотной последовательности вариабельной области LC антигенсвязывающего белка, связывающего TIGIT;

аминокислотную последовательность CDR1 LC, содержащую **Gln27** или его консервативную аминокислотную замену, **Ser28** или его консервативную аминокислотную замену, **Val29** или его консервативную аминокислотную замену, **Ser30** или его консервативную аминокислотную замену, **Ser31** или его консервативную аминокислотную замену, **Thr32** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr33** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию; аминокислотную последовательность CDR2 LC, содержащую **Glu1** или ее консервативную аминокислотную замену, **Ile2** или его консервативную аминокислотную замену, **Ser68** или его консервативную аминокислотную замену, **Gly69** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию; аминокислотную последовательность CDR3 LC, содержащую **Tyr92** или его консервативную аминокислотную замену, **Asp93** или его консервативную аминокислотную замену, **Val94** или его консервативную аминокислотную замену, **Ser95** или его консервативную аминокислотную замену, **Pro96** или его консервативную аминокислотную замену, **Trp97**

или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию; аминокислотную последовательность CDR1 HC, содержащую **Gly32** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr35** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию; аминокислотную последовательность CDR2 HC, содержащую **Tyr52** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr54** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr55** или его консервативную аминокислотную замену, **Ser56** или его консервативную аминокислотную замену, **Ser58** или его консервативную аминокислотную замену, **Thr59** или его консервативную аминокислотную замену, **Phe60** или его консервативную аминокислотную замену, **Pro63** или его консервативную аминокислотную замену, **Lys66** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию; аминокислотную последовательность CDR3 HC, содержащую **Arg102** или его консервативную аминокислотную замену, **Asn104** или его консервативную аминокислотную замену, **Trp105** или его консервативную аминокислотную замену, **Asn106** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr107** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию; где номер положения указан относительно аминокислотной последовательности вариабельной области LC антигенсвязывающего белка, связывающего TIGIT;

аминокислотную последовательность CDR1 LC, содержащую **Arg30** или его консервативную аминокислотную замену, **Arg31** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr32** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию; аминокислотную последовательность CDR3 LC, содержащую **Ser91** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr92** или его консервативную аминокислотную замену, **Ser93** или его консервативную аминокислотную замену, **Thr94** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию; где номер положения указан относительно аминокислотной последовательности вариабельной области LC антигенсвязывающего белка, связывающего TIGIT; аминокислотную последовательность CDR1 HC, содержащую **Thr30** или его консервативную аминокислотную замену, **Gly31** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr32** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr33** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию; аминокислотную последовательность CDR2 HC, содержащую **Trp47** или его консервативную аминокислотную замену, **Trp50** или его консервативную аминокислотную замену, **Ser52** или его консервативную аминокислотную замену, **Thr54** или его консервативную аминокислотную замену, **Ser55** или его консервативную аминокислотную замену, **Ala57** или его консервативную аминокислотную замену, **Thr58** или его консервативную аминокислотную замену, **Gly59** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr60** или его консервативную аминокислотную замену, **Gln65** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию; аминокислотную последовательность CDR3 HC, содержащую **Asn101** или его консервативную

аминокислотную замену, **Ser102** или его консервативную аминокислотную замену, **Val103** или его консервативную аминокислотную замену, **Leu104** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr105** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr106** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr107** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию; где номер положения указан относительно аминокислотной последовательности вариабельной области НС антигенсвязывающего белка, связывающего TIGIT;

аминокислотную последовательность CDR1 LC, содержащую **Gln27** или его консервативную аминокислотную замену, **Leu30** или его консервативную аминокислотную замену, **Ser32** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию; аминокислотную последовательность CDR3 LC, содержащую **Ser96** или его консервативную аминокислотную замену, **Ile97** или его консервативную аминокислотную замену, **Gln98** или его консервативную аминокислотную замену, **Leu99** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию; аминокислотную последовательность CDR1 HC, содержащую **Asp33** или его консервативную аминокислотную замену; аминокислотную последовательность CDR2 HC, содержащую **Tyr52** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr54** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr55** или его консервативную аминокислотную замену, **Ser56** или его консервативную аминокислотную замену, **Gly57** или его консервативную аминокислотную замену, **Gly58** или его консервативную аминокислотную замену, **Thr59** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr60** или его консервативную аминокислотную замену, **Pro63** или его консервативную аминокислотную замену, **Lys66** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию; аминокислотную последовательность CDR3 HC, содержащую **Ile102** или его консервативную аминокислотную замену, **Ala104** или его консервативную аминокислотную замену, **Gly107** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr108** или его консервативную аминокислотную замену, **Phe109** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr110** или его консервативную аминокислотную замену, **Phe111** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию; где номер положения указан относительно аминокислотной последовательности вариабельной области НС антигенсвязывающего белка, связывающего TIGIT;

22. Антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, по варианту осуществления 20 или 21, содержащий шесть аминокислотных последовательностей CDR, перечисленных в одной строке таблицы A2, или содержащий шесть аминокислотных последовательностей CDR, выбранных из группы, состоящей из: (a) SEQ ID NO: 113-118; (b) SEQ ID NO: 123-128; (c) SEQ ID NO: 133-138; (d) SEQ ID NO: 143-148; (e) SEQ ID NO: 153-158; (f) SEQ ID NO: 163-168; (g) SEQ ID NO: 173-178; (h) SEQ ID NO: 183-188, (i) SEQ ID NO: 193-198, (j) SEQ ID NO: 203-208, (k) SEQ ID NO: 213-218, (l) SEQ ID NO: 223-228 и (m) SEQ ID NO: 2013-2018.

23. Антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, по любому из вариантов

осуществления 20-22, содержащий (а) аминокислотную последовательность вариабельной области НС, представленную в таблице В2, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-15 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% или приблизительно 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью вариабельной области НС из таблицы В2; (b) аминокислотную последовательность вариабельной области LC, представленную в таблице В2, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-15 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% или приблизительно 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью вариабельной области LC из таблицы В2, или (c) комбинацию (a) и (b).

24. Антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, по варианту осуществления 23, содержащий пару аминокислотных последовательностей вариабельной области НС и вариабельной области LC, перечисленных в одной строке таблицы В2, или содержащий пару аминокислотных последовательностей, выбранную из группы, состоящей из: (a) SEQ ID NO: 111-112, (b) SEQ ID NO: 121-122, (c) SEQ ID NO: 131-132, (d) SEQ ID NO: 141-142, (e) SEQ ID NO: 151-152, (f) SEQ ID NO: 161-162, (g) SEQ ID NO: 171-172, (h) SEQ ID NO: 181-182, (i) SEQ ID NO: 191-192, (j) SEQ ID NO: 201-202, (k) SEQ ID NO: 211-212, (l) SEQ ID NO: 221-222 и (m) SEQ ID NO: 2011-2012.

25. Антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, по любому из вариантов осуществления 20-24, содержащий (a) аминокислотную последовательность полноразмерной (FL) НС, представленную в таблице В2, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-50 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% или приблизительно 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью FL НС из таблицы В2; (b) аминокислотную последовательность FL LC, представленную в таблице В2, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-50 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% или приблизительно 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью FL LC из таблицы В2, или (c) комбинацию (a) и (b).

26. Антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, по варианту осуществления 25, содержащий пару аминокислотных последовательностей полноразмерной (FL) НС и FL LC, перечисленных в одной строке таблицы В2, или содержащий пару аминокислотных последовательностей, выбранную из группы, состоящей из: (a) SEQ ID NO: 109-110, (b) SEQ ID NO: 119-120, (c) SEQ ID NO: 129-130, (d) SEQ ID NO: 139-140, (e) SEQ ID NO: 149-150, (f) SEQ ID NO: 159-160, (g) SEQ ID NO: 169-170, (h) SEQ ID NO: 179-180, (i) SEQ ID NO: 189-190, (j) SEQ ID NO: 199-200, (k) SEQ ID NO: 209-210, (l) SEQ ID NO: 219-220 и (m) SEQ ID NO: 2009-2010.

27. Антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, по любому из вариантов осуществления 20-26, который представляет собой антитело.

аминокислотную последовательность определяющей комплементарность области (CDR) 1 тяжелой цепи (HC) под SEQ ID NO: 223 или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности; (b) аминокислотную последовательность CDR2 HC под SEQ ID NO: 224 или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности; (c) аминокислотную последовательность CDR3 HC под SEQ ID NO: 225 или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности; (d) аминокислотную последовательность CDR1 легкой цепи (LC) под SEQ ID NO: 226 или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности; (e) аминокислотную последовательность CDR2 LC под SEQ ID NO: 227 или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью

последовательность, которая отличается только 1-50 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% или приблизительно 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью FL LC под SEQ ID NO: 220, или (с) комбинацию (а) и (b).

29. Антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, по любому из вариантов осуществления 20-26, который представляет собой антигенсвязывающий фрагмент антитела.

30. Антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, по любому из вариантов осуществления 20-26, который представляет собой белковый продукт на основе антитела, необязательно scFv.

31. Полипептид, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO из таблицы A2, B2 или C2, или ее вариантную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% или приблизительно 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO из таблицы, или их комбинацию.

32. Конъюгат, содержащий антигенсвязывающий белок или полипептид, связывающий TIGIT, по любому из предыдущих вариантов осуществления и гетерологичный фрагмент.

33. Конъюгат по варианту осуществления 32, содержащий аминокислотную последовательность антигенсвязывающего белка или полипептида, слитую с другой аминокислотной последовательностью.

34. Нуклеиновая кислота, кодирующая антигенсвязывающий белок или полипептид, связывающий TIGIT, или конъюгат по любому из предыдущих вариантов осуществления.

35. Нуклеиновая кислота, кодирующая легкую цепь, тяжелую цепь или как легкую цепь, так и тяжелую цепь антитела по варианту осуществления 27 или 28.

36. Нуклеиновая кислота по варианту осуществления 34 или 35, где нуклеотидная последовательность кодирует (а) аминокислотную последовательность вариабельной области HC, представленную в таблице B2, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-15 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% или приблизительно 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью вариабельной области HC из таблицы B2; (b) аминокислотную последовательность вариабельной области LC, представленную в таблице B2, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-15 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% или приблизительно 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью вариабельной области LC из таблицы B2, или (с) обе из (а) и (b).

37. Вектор, содержащий одну или несколько нуклеиновых кислот по любому из вариантов осуществления 34-36.

38. Клетка-хозяин, содержащая одну или несколько нуклеиновых кислот по любому из вариантов осуществления 34-36 или один или несколько векторов по варианту осуществления 37.

39. Клетка-хозяин по варианту осуществления 37, где клетка-хозяин продуцирует антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, по любому из вариантов осуществления 20-30.

40. Композиция, содержащая антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, по любому из вариантов осуществления 1-10 и антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, по любому из вариантов осуществления 20-30.

41. Композиция по варианту осуществления 40, где (A) антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, представляет собой 1E1, 1E1.016, 24F1, 29E10, 24F1.001, 29E10_CONS.020, 29E10_CONS.021, 29E10_CONS.022, 29E10_CONS.025, 11E4, 31B3, 27G12, 28F9, 28H7 или 36C8, как описано в таблице A1 или таблице B1, необязательно 24F1, 29E10_CONS.020 или 29E10_CONS.022, (B) антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, представляет собой любой из 55G7.041.008, 58A7.003.008.075, 4G10, 11A3, 28B8, 39D2, 43B7, 55G7, 66H9, 43B7.002.015, 58A7.003.08, 66H9.009 или 58A7, как описано в таблице A2 или таблице B2, необязательно 43B7.002.015 или 66H9.009, или комбинацию (A) и (B).

42. Композиция по варианту осуществления 40 или 41, содержащая (A) 24F1 и 43B7.002.015, (B) 24F1 и 66H9.009, (C) 29E10_CONS.020 и 43B7.002.015, (D) 29E10_CONS.020 и 66H9.009, (E) 29E10_CONS.022 и 43B7.002.015, (F) 29E10_CONS.022 и 66H9.009, (G) 43B7.002.015 и 1E1.016, (H) 43B7.002.015 и 24F1, (I) 43B7.002.015 и 29E10, (J) 66H9.009 и 1E1.016, (K) 66H9.009 и 29E10, (L) 43B7 и 29E10, (M) 43B7 и 24F1 или (N) 43B7 и 11E4.

43. Композиция по любому из пунктов 40-42, где антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, и антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, присутствуют в композиции в соотношении, составляющем приблизительно 1:1.

44. Композиция по любому из вариантов осуществления 40-43, дополнительно содержащая третий антигенсвязывающий белок, который нацеливается на PD-1.

45. Композиция по варианту осуществления 44, где третий антигенсвязывающий белок представляет собой любой антигенсвязывающий белок, связывающий PD-1, описанный в международной патентной заявке № PCT/US2019/013205, которая опубликована в виде WO/2019/140196.

46. Композиция по варианту осуществления 44 или 45, где третий антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность вариабельной области HC под SEQ ID NO: 2033 и аминокислотную последовательность вариабельной области LC под SEQ ID NO: 2034.

47. Набор, содержащий антигенсвязывающий белок по любому из вариантов осуществления 1-10, полипептид по варианту осуществления 11, конъюгат по варианту осуществления 12 или 13, нуклеиновую кислоту по любому из вариантов осуществления

14-16, вектор по варианту осуществления 17, клетку-хозяина по варианту осуществления 18 или 19, антигенсвязывающий белок по любому из вариантов осуществления 20-30, полипептид по варианту осуществления 31, конъюгат по варианту осуществления 32 или 33, нуклеиновую кислоту по вариантам осуществления 34-36, вектор по варианту осуществления 37, клетку-хозяина по варианту осуществления 38 или 39, композицию по любому из вариантов осуществления 40-46 или их комбинацию, и контейнер.

48. Фармацевтическая композиция, содержащая антигенсвязывающий белок по любому из вариантов осуществления 1-10, полипептид по варианту осуществления 11, конъюгат по варианту осуществления 12 или 13, нуклеиновую кислоту по любому из вариантов осуществления 14-16, вектор по варианту осуществления 17, клетку-хозяина по варианту осуществления 18 или 19, антигенсвязывающий белок по любому из вариантов осуществления 20-30, полипептид по варианту осуществления 31, конъюгат по варианту осуществления 32 или 33, нуклеиновую кислоту по вариантам осуществления 34-36, вектор по варианту осуществления 37, клетку-хозяина по варианту осуществления 38 или 39, композицию по любому из вариантов осуществления 40-46 или их комбинацию, и фармацевтически приемлемый носитель, вспомогательное вещество или разбавитель.

49. Способ получения антигенсвязывающего белка, связывающего CD112R, включающий культивирование клетки-хозяина по любому из вариантов осуществления 18 или 19 в целях обеспечения экспрессии антигенсвязывающего белка, связывающего CD112R, и сбор экспрессирующегося антигенсвязывающего белка, связывающего CD112R.

50. Способ получения антигенсвязывающего белка, связывающего TIGIT, включающий культивирование клетки-хозяина по любому из вариантов осуществления 38 или 39 в целях обеспечения экспрессии антигенсвязывающего белка, связывающего TIGIT, и сбор экспрессирующегося антигенсвязывающего белка, связывающего TIGIT.

51. Способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции по варианту осуществления 48 в количестве, эффективном для лечения субъекта.

52. Способ по варианту осуществления 51, где у субъекта имеется солидная опухоль, и фармацевтическую композицию вводят субъекту в количестве, эффективном для лечения солидной опухоли у субъекта.

53. Способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, первой фармацевтической композиции, содержащей антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, и антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, и второй фармацевтической композиции, содержащей ингибитор PD-1.

54. Способ по варианту осуществления 53, где у субъекта имеется солидная опухоль, и первую фармацевтическую композицию и вторую фармацевтическую композицию вводят в количествах, эффективных для лечения солидной опухоли у субъекта.

[00219] Следующие примеры приведены лишь для иллюстрации настоящего изобретения и не ограничивают каким-либо образом его объем.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1

[00220] В данном примере описана экспрессия рецептора и лиганда семейства TIGIT в раковых и нормальных Т-клетках.

[00221] Корреляционные анализы выполняли с данными секвенирования РНК из Атласа ракового генома (TCGA) при многих показаниях при опухолях для оценки коэкспрессии представителей семейства TIGIT друг с другом и с PD-1. Такие же анализы выполняли для лигандов представителей семейства TIGIT и PD-1. Показания при опухолях включали показания при инвазивной карциноме молочной железы (BRCA), светлоклеточной карциноме почек (KIRC), плоскоклеточной карциноме шеи (HNSC) и кожной меланоме кожи (SKCM).

[00222] Как показано в верхнем ряду на фигуре 1A, большинство рецепторов семейства TIGIT демонстрировали положительную корреляцию друг с другом при большинстве показаний при опухолях, что свидетельствует о том, что многие из этих рецепторов коэкспрессируются при раке или опухолях. Напротив, лиганды представителей семейства TIGIT демонстрировали ограниченную корреляцию (нижний ряд на фигуре 1A); при этом наиболее высокая корреляция наблюдается между CD112 и CD155. Остальные лиганды не демонстрировали высокую корреляцию друг с другом или с PD-L1.

[00223] Также анализировали данные секвенирования РНК одиночных клеток из лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль (TIL), из карциномы печени человека, и данные свидетельствовали о том, что хотя экспрессия TIGIT и PD-1 перекрывается, экспрессия CD112R была более широкой (фигура 1B). Сходные результаты получали из дополнительных наборов данных секвенирования РНК одиночных клеток из TILS при колоректальном раке (CRC) и немелкоклеточном раке легкого (NSCLC) (данные не показаны).

[00224] CD112R является самым последним пополнением семейства рецепторов TIGIT. Ранее было показано, что он экспрессировался на НК-клетках и активированных Т-клетках и преимущественно экспрессировался на CD8 Т-клетках. Было подтверждено, что экспрессия CD112R индуцируется на CD8 Т-клетках при активации, и что значительная часть этих клеток также коэкспрессирует PD-1 и TIGIT, что соответствует схеме, в пользу которой свидетельствовали данные секвенирования РНК одиночных клеток (фигура 1C).

[00225] Для определения экспрессии CD112R, TIGIT и PD-1, а также лигандов CD112 и CD155 в первичных клетках человека, оценивали экспрессию этих молекул на иммунных клетках, инфильтрирующих опухоль, и опухолевых клетках из опухолевых тканей человека. Среди ограниченного числа образцов относительная экспрессия рецепторов, выявляемая посредством FACS, значительно варьировалась (фигура 1D). Кроме того, было обнаружено, что экспрессия лиганда на Epcam+ CD45- опухолевых

клетках по сравнению с Ерсам- CD45+ иммунными клетками значительно различалась. Как показано на фигуре 1Е, CD112 и CD155 коэкспрессировались при высоких уровнях в Ерсам+ CD45- опухолевых клетках, но экспрессировались при низких уровнях на внутриопухолевых иммунных клетках, при этом значительно меньше клеток экспрессировали оба лиганда. CD45+ Ерсам- миелоидные клетки среди РВМС демонстрировали отсутствие или незначительное количество клеток, коэкспрессирующих эти лиганды.

[00226] Эти результаты демонстрируют профили экспрессии CD112R, TIGIT и PD-1.

ПРИМЕР 2

[00227] В данном примере демонстрируется, что блокада CD112R усиливает Т-клеточные ответы.

[00228] Для демонстрации функции CD112R в Т-клетках разрабатывали систему анализа *in vitro* с применением сконструированных клеток CHO, которые стабильно экспрессируют активатор CD112 и CD3. Очищенные пан-Т-клетки человека предварительно активировали антителами к CD3/CD28, а затем оставляли в покое. Когда CD112R, экспрессируемый на поверхности Т-клеток, связывается с CD112, экспрессируемым на поверхности клеток CHO, ожидается, что высвобождение IL-2 будет подавляться. Иллюстрация анализа представлена на фигуре 2А. Было подтверждено, что Т-клетки индуцировали экспрессию CD112R на клеточной поверхности (фигура 2В). Способность инструментальных антител связываться с CD112R и блокировать высвобождение IL-2 тестировали с применением данной системы анализа. Инструментальные антитела (PL-52575; PL-52576 и PL-52577) демонстрировали дозозависимое связывание с клетками, экспрессирующими huCD112R (фигура 2С), и относительная аффинность/авидность этих антител коррелировала с их способностью блокировать связывание лиганда (фигура 2D). Краткое описание значений EC50 и IC50 этих инструментальных антител представлено в таблице ниже.

	PL-52575	PL-52576	PL-52577	Лиганд CD112 человека
EC50 (нг/мл)	388,8	1100	2913	1606
EC50 (нМ)	2,59	7,33	19,42	12,75
IC50 (нг/мл)	31,9	100,3	6,4	Nd
IC50 (нМ)	0,21	0,67	0,04	Nd
Макс. ингибирование (%)	100	40	101	

[00229] С применением данной системы анализа инструментальные антитела приводили к дозозависимому усилению Т-клеточной активности в присутствии экспрессирующих CD112 клеток CHO (синие кружки, красные квадраты и зеленые

треугольники на фигуре 2E). Способность антител индуцировать активность зависела от присутствия CD112 на клетках CHO, поскольку когда клетки CHO ложно трансфицировали вектором без вставки, и они не экспрессировали CD112, Т-клеточная активность не усиливалась. Эти данные свидетельствуют о том, что взаимодействие CD112 с CD112R ингибирует Т-клеточный ответ.

[00230] Как было показано ранее, CD112 активирует CD226 для индукции костимулирующего сигнала. Важно отметить, что опосредованная CD112 костимуляция Т-клеток в отсутствие CD112R полностью контролируется с помощью CD226 (фигура 2F), что дополнительно подтверждает, что CD112R в первую очередь ингибирует CD226-зависимый костимулирующий сигнал посредством связывания с тем же лигандом, что и CD226.

[00231] Эти результаты свидетельствуют о том, что блокада CD112R является хорошей стратегией усиления Т-клеточного ответа.

ПРИМЕР 3

[00232] В данном примере демонстрируется получение моноклональных антител (mAb) к CD112R.

[00233] Полностью человеческие антитела к CD112R человека получали следующим образом.

[00234] *Генерирование иммунных ответов против CD112R*

[00235] *Линии мышей*

[00236] Полностью человеческие антитела к CD112R человека получали посредством иммунизации трансгенных мышей XENOMOUSE® (патенты США №№ 6114598; 6162963; 6833268; 7049426; 7064244, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте; Green et al., 1994, Nature Genetics 7:13-21; Mendez et al., 1997, Nature Genetics 15:146-156; Green and Jakobovits, 1998, J. Ex. Med, 188:483-495; Kellerman and Green, Current Opinion in Biotechnology 13, 593-597, 2002). Для этих иммунизаций применяли животных линий XMG4-K, XMG4-KL, XMG2-K и XMG2-KL XENOMOUSE®. Кроме того, получали специально разработанную линию мышей XMG2 CD112R KO (Horizon Discovery).

[00237] *Иммунизации*

[00238] Репертуары антител генерировали с применением нескольких различных стратегий иммунизации, применяемых к различным линиям XenoMouse, включая линию с нокаутом XenoMouse XMG2 CD112R KO. У животных брали кровь и плазму крови собирали в различных временных точках в ходе исследований с использованием иммунизации продолжительностью от 4 недель до 10 недель для оценки титров CD112R-специфических антител.

[00239] Титры CD112R-специфических антител в сыворотке крови отслеживали посредством FACS-анализа живых клеток на проточном цитометре Accuri. Вкратце, клетки HEK293 подвергали ложной трансфекции или временной трансфекции с помощью либо CD112R человека, либо CD112R яванского макака. Образцы сыворотки крови от

иммунизированных животных разводили в 100 раз и инкубировали на трансфицированных клетках в течение 1 часа на льду. Затем клетки промывали с удалением несвязавшихся антител, и вторичное антитело, специфическое в отношении Fc IgG человека, меченное с помощью Cy5, инкубировали на клетках в течение дополнительных 15 минут при 4 градусах. Клетки промывали один раз для удаления несвязанного вторичного антитела, и флуоресцентный сигнал на клетках количественно определяли с помощью FACS. Животных с наивысшими титрами антиген-специфических нативных антител в сыворотке крови, направленных против CD112R человека и яванского макака, применяли для получения гибридомы (Kohler and Milstein, 1975). Линиями животных для сбора 1 и сбора 3 были XMG2/XMG4, а линией для сбора 2 была XMG2kl.

[00240] Получение моноклональных антител

[00241] Получение гибридомы

[00242] Животных, проявляющих подходящие титры в сыворотке крови, идентифицировали, и получали лимфоциты из селезенки и/или дренирующих лимфатических узлов. Объединенные лимфоциты (из каждого сбора) отделяли от лимфоидной ткани путем измельчения в подходящей среде (например, модифицированной по Дульбекко среде Игла (DMEM); Invitrogen, Карлсбад, Калифорния). В-клетки отбирали и/или обеспечивали увеличение их количества с применением стандартных способов и сливали с подходящим партнером по слиянию с применением методик, которые были известны из уровня техники. Гибридомы, продуцирующие антитела, затем высевали с использованием антиген-специфической сортировки на основе FACS или посредством стандартных методик поликлонального посева.

[00243] *Антиген-специфическое окрашивание клеток гибридомы*

[00244] Клетки гибридомы извлекали из колбы и промывали в стерильном буфере для FACS (PBS с 2% FBS). Затем клетки окрашивали растворимым белком CD112R человека и инкубировали при 4 градусах Цельсия в течение 1 часа. Клетки снова промывали в буфере для FACS и окрашивали с помощью 1 мл смеси для детектирования, содержащей 5 мкг/мл F(ab')₂-фрагмента антитела козы к Fc IgG человека, конъюгированного с Alexa Fluor 488 (Jackson, кат.: 109-546-098), и стрептавидина, конъюгированного с Alexa Fluor 647 (Jackson, кат.: 016-600-084), затем инкубировали при 4 градусах Цельсия в течение 30 минут в темноте. Клетки снова промывали в буфере для FACS, ресуспендировали в среде и затем пропускали через сито для клеток с размером отверстий 40 микрон для удаления агрегированных клеток. Антиген-специфические клетки сортировали с применением BD FACSAria 3 путем гейтирования по популяции, проявляющей как флуоресценцию, обусловленную Alexa Fluor 488, так и флуоресценцию, обусловленную Alexa Fluor 647 (IgG⁺ и антигенсвязывающие клетки).

[00245] Сортированные клетки культивировали в течение нескольких дней в среде для гибридомы. После подтверждения успешного обогащения CD112R-специфических клеток, гибридомы затем сортировали по отдельным клеткам в 384-луночные планшеты

для микротитрования с применением BD FACSAria 3. Через 2 недели культивирования из планшетов для микротитрования собирали образцы надосадочной жидкости и осуществляли их скрининг в отношении связывания CD112R.

[00246] *Начальный отбор антител, специфически связывающих CD112R*

[00247] Порядок скрининговых анализов, используемых для идентификации и отбора антител к CD112R человека, показан на фигуре 3.

[00248] *Анализ специфичности CD112R человека*

[00249] Трансфицированные клетки использовали для оценки специфичности связывания антитела с использованием проточной цитометрии на клетках эмбриональной почки человека (НЕК) 293Т следующим образом. Белки экспрессировали на клетках НЕК 293Т посредством трансфекции с применением CD112R человека, CD112R мыши, CD112R крысы, CD96 человека, CD226 человека или контрольных векторов экспрессии, среды Gibco™ Opti-MEM® (Gibco, кат. № 31985088) и реагента 293Fectin™ (Invitrogen, кат. № 12347019) в соответствии с протоколом, установленным производителем. Через 24 часа трансфицированные клетки ресуспендировали в буфере для FACS (PBS+2% эмбриональной бычьей сыворотки) и добавляли в 96-луночный планшет. Образцы надосадочной жидкости гибридомы добавляли таким образом, чтобы конечная концентрация составляла 2,5 мкг/мл, за исключением 11E4, который тестировали при конечном разбавлении, составляющем 1:10, клетки ресуспендировали и инкубировали в течение 1 часа при 4°C. Планшеты дважды промывали буфером для FACS, центрифугировали с осаждением клеток, удаляли надосадочную жидкость и ресуспендировали в буфере для FACS с удалением несвязавшегося антитела. Затем в каждую лунку добавляли козье вторичное антитело к IgG человека, конъюгированное с Alexa Fluor 488 (специфическое в отношении фрагмента Fcγ) (Jackson ImmunoResearch, кат. № 109-545-098), полученное в буфере для FACS при 5 мкг/мл, клетки ресуспендировали и инкубировали в течение 15 минут при 4°C. Планшеты дважды промывали буфером для FACS, центрифугировали с осаждением клеток, удаляли надосадочную жидкость и ресуспендировали в буфере для FACS с удалением несвязавшегося вторичного антитела. Затем образцы ресуспендировали в буфере для FACS и анализировали на проточном цитометре BD Accuri™ с автоматическим пробоотборником Intellicyt HyperCyt. Количество молекул, связывающих CD112R человека, для сбора 1, сбора 2 и сбора 3 составляло 216, 539 и 569 соответственно. Антитела к huCD112R были селективными в отношении CD112R человека и не демонстрировали перекрестного взаимодействия с CD112R мыши или крысы (данные не показаны).

[00250] *Репортерный анализ гена (RGA) CD112R человека/NFAT-люциферазы с клетками Jurkat*

[00251] Для скрининга гибридом или очищенных антител к CD112R, способных усиливать Т-клеточную активность посредством блокирования взаимодействия CD112-CD112R, разрабатывали репортерный анализ с применением NFAT в клетках Jurkat

(фигура 4А). Клетки Jurkat, стабильно экспрессирующие CD112R человека и репортерный ген NFAT-люциферазы (полученные в собственной лаборатории с применением линии клеток Jurkat, экспрессирующих NFAT-люциферазу, от Promega, кат. № CS176401), культивировали в среде RPMI 1640 (Sigma), дополненной 10% эмбриональной бычьей сывороткой (Sigma), 2 mM L-глутамином (Sigma), 10 mM HEPES (Hyclone, GE Healthcare Life Sciences), 1X MEM NEAA (Sigma), 1X пируватом натрия (Sigma), 500 мкг/мл генетицина (Invitrogen) и 0,5 мкг/мл пуромидина (Invitrogen). Клетки клона C4 Jurkat, экспрессирующие NFAT-люциферазу/CD112R, стимулировали за счет активации Т-клеточного рецептора посредством совместного культивирования с клетками яичника китайского хомячка (CHO)-K1, стабильно экспрессирующими CD112 человека и активатор Т-клеток человека (полученными в собственной лаборатории). 1×10^4 CHO-K1-CD112+ клеток высевали в белые 96-луночные планшеты с половинным объемом (Costar, кат. № 3688) в полной среде для выращивания, содержащей питательную смесь F12 HAM (Sigma), 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 10 mM HEPES, 500 мкг/мл генетицина, 200 мкг/мл гидромицина В (Invitrogen) и 100 мкг/мл зеоцина (Invitrogen), в течение ночи при 37°C/5% CO₂. После инкубации в течение ночи среду для выращивания заменяли на 5×10^4 клеток клона C4 Jurkat, экспрессирующих NFATluc/CD112R, в присутствии образцов надосадочной жидкости гибридом или антител с соответствующими контролями в среде для анализа (среда RPMI 1640, дополненная 1% эмбриональной бычьей сывороткой, 2 mM L-глутамином, 10 mM HEPES) и инкубировали при 37°C/5% CO₂ в течение 18 ч. Репортерный сигнал в каждой лунке определяли с применением системы анализа люциферазы Bio-Glo (Promega, кат. № G7940) в соответствии с рекомендацией производителя. Люминесценцию выявляли с применением планшет-ридера EnVision (Perkin Elmer). Для одноточечного анализа определяли количество IgG человека в образцах надосадочной жидкости истощенной культуры гибридомы, нормализовывали до фиксированной концентрации и тестировали при 2,0 мкг/мл. Антител, которые приводили к 3-кратной или более высокой индукции сигнала NFAT-люциферазы, было в общей сложности 216, и их отбирали для последующих процедур скрининга.

[00252] *Анализ связывания первичных клеток*

[00253] Связывание образцов надосадочной жидкости гибридомы с CD112R, экспрессируемым первичными клетками человека и яванского макака, тестировали посредством проточной цитометрии. Для анализа связывания первичных клеток человека очищенные Т-клетки человека (Biological Specialty Corp.) размораживали и суспендировали при концентрации $2,5 \times 10^6$ клеток/мл. Т-клетки стимулировали с помощью 5 мкг/мл клона ОКТ3 антитела к CD3 человека, (eBioscience) и 1 мкг/мл антитела к CD28 человека (BD Pharmingen) в течение 72 часов при 37°C/5% CO₂ в планшете, который был предварительно покрыт с помощью 5 мкг/мл антитела к Fc IgG мыши (Pierce). Через 72 часа клетки удаляли, промывали и суспендировали при концентрации $0,5 \times 10^6$ клеток/мл с 10 нг/мл IL-2 (Pepro Tech). Затем клетки инкубировали в течение еще 5 дней при 37°C/5% CO₂. Для анализа связывания первичных клеток

яванского макака PBMC яванского макака (SNBL) размораживали и суспендировали при концентрации от 4×10^6 до 5×10^6 клеток/мл. PBMC стимулировали с помощью 1 мкг/мл клона SP34 антитела к CD3 человека (BD Pharmingen) и 1 мкг/мл антитела к CD28 человека (BD Pharmingen) в течение 72 часов при 37°C/5% CO₂ в планшете, который был предварительно покрыт с помощью 5 мкг/мл антитела к Fc IgG мыши (Pierce). Через 72 часа клетки удаляли, промывали и суспендировали при концентрации $0,5 \times 10^6$ клеток/мл с 20 нг/мл IL-2 (Pepro Tech). Затем клетки инкубировали в течение еще 7 дней при 37°C/5% CO₂.

[00254] Полную замену среды с добавлениями свежего IL-2 один раз в 48-72 часа проводили как для клеток человека, так и для клеток макака-крабоеда. При каждой замене среды клетки суспендировали при концентрации $0,5 \times 10^6$ клеток/мл. После заключительной инкубации клетки подготавливали для проточной цитометрии посредством инкубации с нормализованными образцами надосадочной жидкости гибридомы, антителами положительного контроля и антителами изотипического контроля при конечной концентрации 10 мкг/мл. F(ab')²-фрагмент козьего антитела к IgG человека (H+L), конъюгированный с Alexa Fluor 647 AffiniPure (Jackson ImmunoResearch), при 5 мкг/мл применяли для выявления с помощью вторичного антитела, и 8,25 нМ YoPro1 (Invitrogen) применяли для окрашивания живых/мертвых клеток. Затем клетки анализировали на проточном цитометре BD FACSCanto II для выявления связывания антитела к CD112R.

[00255] В цикле 1 было идентифицировано более 1200 антител, которые связываются с рецептором CD112R человека, временно экспрессируемым на клетках 293T. Было обнаружено, что из них 216 антител связываются с эндогенным рецептором CD112R человека, экспрессируемым на клетках Jurkat, а также функционируют как антагонисты активности CD112R. Для идентификации антител, которые перекрестно взаимодействуют с ортологом CD112R яванского макака, панель из > 1200 рекомбинантных человеческих связывающих молекул тестировали в отношении связывания с рекомбинантным CD112R макака-крабоеда, временно экспрессируемым на клетках HEK293T. Было обнаружено, что двести семьдесят четыре антитела из панели связываются с CD112R макака-крабоеда, и было обнаружено, что только два из них (11E4 и 1E1) связываются с эндогенным CD112R макака-крабоеда, экспрессируемым на первичных Т-клетках макака-крабоеда.

[00256] *Второй цикл и отбор антител*

[00257] Проводили второй цикл иммунизаций Xenomouse с использованием специально разработанной линии мышей с нокаутом (KO) XMG2 CD112R в дополнение к линии XMG2kl. Клетки гибридомы получали, как в целом описано выше, и скрининговые анализы, описанные на фигуре 3, использовали для идентификации и отбора антител к CD112R человека. Репрезентативные данные сборов 6-9 из второго цикла показаны на фигурах 4B и 4C. Второй цикл привел к обнаружению более 1300 антител, специфических в отношении CD112R человека, из которых 350 приводили к 3-кратной или более высокой

индукции сигнала NFAT-люциферазы, как определено посредством RGA с клетками Jurkat. На панели цикла 2 рекомбинантных молекул, связывающих CD112R человека, только 336 связывались с рекомбинантным CD112R макака-крабоеда, временно экспрессируемым на клетках 293T, и только 27 антител связывались с эндогенным CD112R макака-крабоеда, экспрессируемым на первичных Т-клетках макака-крабоеда.

[00258] Краткое описание характеристик сборов антител из первого и второго циклов представлены на фигурах 5A и 5B. Антитела, которые демонстрировали антагонистическую функцию, как определено посредством RGA с клетками Jurkat, и антигенсвязывающую активность, как определено посредством анализов связывания первичных клеток человека и макака-крабоеда, передавали для последующих процедур скрининга характеристик, секвенирования и определения аффинности.

[00259] *Высокопроизводительное ранжирование антител к hCD112R по аффинности KinExA с растворимым hCD112R*

[00260] Отобранные моноклональные антитела, специфические в отношении CD112R человека, ранжировали по аффинности с применением высокопроизводительного (HT) метода KinExA и с применением порогового значения K_d, составляющего 100 пМ. Данный метод основан на теории, согласно которой, если антитело находится в равновесии с концентрацией антигена при пороговом значении K_d и с концентрацией Ab ниже концентрации при пороговом значении K_d, то свободное Ab, присутствующее в равновесии, будет составлять 50% или меньше, если его K_d составляет 100 пМ или меньше.

[00261] Вкратце, эксперимент проводили посредством уравнивания 25 пМ каждого антитела со 100 пМ hCD112R или без него в PBS/0,05% NaN₃/0,01% BSA в течение 24 ч при комнатной температуре. При равновесии концентрацию свободного антитела, присутствующего в равновесной смеси и в пробирке с одним антителом, измеряли в KinExA. Гранулы из PMMA, покрытые hCD112R, использовали для захвата свободного Ab, и выявление осуществляли с применением смеси антитела Mu к hIgG2, G3, G4+антитело к muIgG (H+L), конъюгированное с Alexa647.

[00262] Сигнал KinExA, генерируемый одним антителом, принимается за сигнал от 100% свободного антитела, и % ингибируемой свободной фракции (IFF) рассчитывается на основе сигнала, измеренного в присутствии антигена, следующим образом:

$$\% \text{ IFF} = \frac{\text{Сигнал KinExA, полученный в присутствии антигена}}{\text{Сигнал KinExA, полученный в отсутствие антигена}} * 100$$

[00263] Антитела, которые демонстрируют наиболее низкий % IFF, характеризуются наиболее высокой аффинностью, и наоборот, антитело, которое демонстрирует наиболее высокий % IFF, характеризуется наиболее низкой аффинностью, и их можно ранжировать посредством нанесения % IFF на график. Моноклональные антитела, которые приводят к получению IFF, составляющей 50% или меньше, должны

пройти пороговое значение K_d , составляющее 100 пМ, что означает, что они должны характеризоваться значением K_d , составляющим 100 пМ или меньше, соответственно.

[00264] Результаты показаны на фигуре 6. Из десяти проанализированных антител восемь демонстрировали значение K_D ниже 100 пМ, и только два демонстрировали значение K_D выше 100 пМ.

[00265] *Молекулярное выделение и секвенирование антагонистических антител к CD112R*

[00266] Выполняли молекулярное секвенирование тяжелых и легких цепей выбранных антител к CD112R. Вкратце, РНК (суммарную или мРНК) очищали из лунок, содержащих клетки гибридомы, продуцирующие антагонистические антитела к CD112R, с применением набора Qiagen RNeasy mini или набора Invitrogen mRNA catcher plus. Очищенную РНК применяли для амплификации генов варибельной области (V) тяжелой и легкой цепей антитела с применением синтеза кДНК посредством обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (RT-PCR). Тяжелую цепь гамма полностью человеческого антитела получали с применением набора для одностадийной ПЦР с применением обратной транскриптазы Qiagen (Qiagen). Этот способ применяли для получения кДНК первой цепи из матрицы РНК, а затем для амплификации варибельной области тяжелой цепи гамма с применением мультиплексной ПЦР. Праймер, специфический к 5'-концу цепи гамма, отжигался с сигнальной последовательностью тяжелой цепи антитела, тогда как 3'-концевой праймер отжигался с областью константного домена цепи гамма. Полностью человеческую легкую цепь каппа получали с применением набора для одностадийной ПЦР с применением обратной транскриптазы Qiagen (Qiagen). Этот способ применяли для получения кДНК первой цепи из матрицы РНК, а затем для амплификации варибельной области легкой цепи каппа с применением мультиплексной ПЦР. Праймер, специфический к 5'-концу легкой цепи каппа, отжигался с сигнальной последовательностью легкой цепи антитела, тогда как 3'-концевой праймер отжигался с областью константного домена цепи каппа. Полностью человеческую легкую цепь лямбда получали с применением набора для одностадийной ПЦР с применением обратной транскриптазы Qiagen (Qiagen). Этот способ применяли для получения кДНК первой цепи из матрицы РНК, а затем для амплификации варибельной области легкой цепи лямбда с применением мультиплексной ПЦР. Праймер, специфический к 5'-концу легкой цепи лямбда, отжигался с сигнальной последовательностью легкой цепи, тогда как 3'-концевой праймер отжигался с областью константного домена цепи лямбда.

[00267] Амплифицированную кДНК очищали с помощью ферментов с применением экзонуклеазы I и щелочной фосфатазы, и последовательность очищенного продукта ПЦР определяли прямым секвенированием. Аминокислотные последовательности выводили из соответствующих последовательностей нуклеиновой кислоты с помощью методов биоинформатики. Для каждого образца гибридомы выполняли по два дополнительных независимых цикла амплификации посредством RT-

PCR и секвенирования, чтобы подтвердить то, что любые наблюдаемые мутации не были следствием ПЦР. Затем полученные аминокислотные последовательности анализируют для определения исходной последовательности зародышевой линии антител и для идентификации отклонений от последовательности зародышевой линии. Аминокислотные последовательности, соответствующие областям, определяющим комплементарность (CDR), секвенированных антител, выравнивали, и результаты такого выравнивания применяли для группировки клонов по сходству. Последовательности также анализировали в отношении "горячих точек" (остатков, которые были предсказаны с помощью вычислительной техники или эмпирически определены как негативно влияющие на экспрессию, очистку, термостабильность, коллоидную стабильность, стабильность при длительном хранении, фармакокинетику *in vivo* и/или иммуногенность молекулы). Результаты анализа посредством секвенирования показаны на фигуре 7А. На фигуре 7В перечислены антитела, проанализированные в отношении разнообразия последовательностей, и указаны остатки зародышевого типа VH и CDR3 HC. Также перечислены значения IC50 (нМ), определенные посредством RGA с клетками Jurkat для каждого антитела. На основании анализа разнообразия последовательностей и анализа "горячих точек" перечень антител на фигуре 7В сокращали до следующих антител для перехода к следующему раунду скрининга: 1E1, 11E4, 27G12, 29E10, 31B3 и 24F1.

[00268] *Конкурентный анализ рецептор CD112R человека - лиганд*

[00269] Образцы надосадочной жидкости гибридомы, связывающие CD112R человека, тестировали в отношении их способности блокировать CD112L человека с применением проточной цитометрии на гранулах следующим образом. Биотинилированный CD112R человека-Fc захватывали на полистироловых гранулах со стрептавидином (Spherotech, кат. № SVP-60-5) в буфере для FACS и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. Гранулы дважды промывали буфером для FACS, центрифугировали с осаждением гранул, удаляли надосадочную жидкость и ресуспендировали в буфере для FACS с удалением несвязавшегося белка. Гранулы, покрытые биотинилированным CD112R человека, добавляли в 96-луночный планшет. Добавляли образцы надосадочной жидкости гибридомы таким образом, чтобы конечная концентрация составляла 5 мкг/мл, гранулы ресуспендировали и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Меченный с помощью Alexa Fluor 647 Zenon™ (Molecular Probes, кат. № Z25408) лиганд CD112-huFc, меченный в соответствии с протоколом, описанным производителем, полученный в буфере для FACS, добавляли до конечной концентрации 370 нг/мл, инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре в темноте. Гранулы один раз промывали буфером для FACS, центрифугировали с осаждением гранул, удаляли надосадочную жидкость и ресуспендировали в буфере для FACS с удалением несвязавшегося лиганда. Затем образцы ресуспендировали в буфере для FACS и анализировали на проточном цитометре BD Accuri™ с автоматическим пробоотборником Intellicyt HyperCyt.

[00270] Результаты показаны на фигуре 8. Как показано на данной фигуре, все

шесть антител (1E1, 11E4, 27G12, 29E10, 31B3 и 24F1) демонстрировали значительную ингибирующую активность, предотвращая связывание приблизительно 90% или больше лиганда CD112 с рецептором CD112R. Ингибирующая активность шести антител была сопоставима с активностью двух эталонных антител к CD112R, PL-52575 и PL-52577, характеризующихся значениями IC₅₀, составляющими 0,12 нМ и 0,10 нМ соответственно.

[00271] *Сортировка на основании конкуренции для ведущей панели антител к CD112R*

[00272] Отобранные образцы надосадочной жидкости гибридомы, связывающие CD112R человека, тестировали для сортировки на основании конкуренции с применением платформы Octet HTX. Антитела загружали на биосенсоры (кинетические) с антителом к HuFc от ForteBio, кат. № 18-5064, при 2 мкг/мл в течение двух минут в буфере для анализа, содержащем 10 мМ Tris, 0,1% Triton, 150 мМ NaCl, 1 мМ CaCl₂, 0,1 мг/мл BSA, pH 7,4. Затем биосенсоры блокировали с помощью 50 мкг/мл нерелевантного HuIgG2 в буфере для анализа в течение пяти минут. CD112R при 1 мкг/мл связывали в течение двух минут в буфере для анализа, затем биосенсоры погружали в буфер для анализа на одну минуту для установления исходного сигнала. После установления исходного сигнала антитела при 2 мкг/мл (которые отличались от антитела, связанного с биосенсорами) тестировали в отношении способности успешно конкурировать с антителом, связанным с биосенсорами, за связывание с CD112R. Данные анализировали с применением программного обеспечения для анализа данных ForteBioHT V11.1, в котором определяется сигнал в конце второй стадии связывания антител. Если сигнал в конце второй стадии связывания антитела отличается от исходного уровня, то второе антитело успешно конкурирует с первым антителом за связывание с CD112R.

[00273] Схема стадий этого анализа показана на фигуре 9А. На этой схеме антитело 31B3 связано с биосенсором. Если антитело, используемое на второй стадии связывания антитела, является таким же, как антитело, связанное с биосенсором, то сигнал не изменяется относительно исходного уровня. См. линию голубого цвета. Однако если антитело, используемое на второй стадии связывания антитела, отличается от антитела, связанного с биосенсором, например, 24F1, и сигнал выше исходного сигнала, то второе антитело помещают в группу А. См. линию фиолетового цвета. Если антитело, используемое на второй стадии связывания антитела, отличается от антитела, связанного с биосенсором, и сигнал не выше исходного уровня, то антитело помещают в группу В.

[00274] Результаты показаны на фигуре 9В. Как показано на этой фигуре, все из антител 24F1, 27G12, 29E10, 1E1 и 11E4 конкурировали друг с другом, и их относили к группе А. Антитело 31B3 не конкурировало с другими антителами, и поэтому его относили к группе В.

[00275] *Подтверждение связывания с первичными Т-клетками человека и макака-крабоеда*

[00276] Первичные Т-клетки человека и макака-крабоеда получали и анализировали, как в целом описано выше. Образцы надосадочной жидкости истощенных

культур гибридомы, содержащие антитела 1E1, 11E4, 27G12, 29E10, 31B3 и 24F1, подвергали количественному анализу, затем титровали в отношении связывания на поверхности первичных Т-клеток. Анализ посредством аппроксимации кривой с применением Prism позволил определить значение EC50 для связывания с первичными клетками.

[00277] Для всех антител 1E1, 11E4, 27G12, 29E10, 31B3 и 24F1 значения EC50 для связывания с Т-клетками человека были до 10 раз больше значения для связывания с РВМС макака-крабоеда.

[00278] Вкратце, культивированные Т-клетки человека и РВМС макака-крабоеда инкубировали с ведущей панелью, начиная с 3 мкг/мл для человека или 5 мкг/мл для макака-крабоеда, и титровали в соотношении 1 к 3 для определения наиболее низкой концентрации, составляющей 0,001 мкг/мл для человека и 0,002 мкг/мл для макака-крабоеда. Козье антитело к Fc IgG человека, конъюгированное с AF 647, при 5 мкг/мл использовали в качестве вторичного антитела, и YoPro1 использовали в качестве красителя для окрашивания живых/мертвых клеток. Истощенную надосадочную жидкость (ESN) использовали для всех ведущих антител, за исключением 1E1 и 1E3, для этих двух антител использовали очищенные mAb. 11B1, который является структурно близким с 11E4, использовали в анализах, поскольку 11E4 ESN было недостаточно. Для анализа FCS Express использовали для получения геометрических средних значений, и Screener использовали для определения кратности по сравнению с изотипическим контролем, кривых титрования и значений EC50.

[00279] Результаты анализа с использованием РВМС макака-крабоеда и Т-клеток человека показаны на фигурах 10А и 10В соответственно и в таблице 1. На графиках с фигур 10А и 10В представлена кратность сигнала изотипического контроля, нанесенная на график в виде зависимости от log концентрации указанного антитела. В таблице 1 представлены значения EC50 (нг/мкл) для каждого антитела.

ТАБЛИЦА 1

Антитело	EC50 (нг/мкл) для CD112R на РВМС макака-крабоеда	EC50 (нг/мкл) для CD112R на Т-клетках человека
1E1	0,0087	0,020
29E10	0,0322	0,033
24F1	0,0334	0,034
27G12	0,1737	0,089
11B1*	0,0281	0,108
31B3	0,898	0,127

**Сходно по структуре с 11E4*

[00280] Как показано в таблице 1, 1E1 демонстрировало наиболее высокую аффинность связывания с CD112R, экспрессируемым первичными клетками человека и

макака-крабоведа. Значения EC50 29E10 и 24F1 были очень сходными между двумя видами и друг с другом. 11B1 характеризовалось высоким значением EC50, составляющим 0,108 нг/мкл, в случае человека, но низким значением EC50, составляющим 0,0281 нг/мкл, в случае макака-крабоведа.

[00281] *Подтверждение эффективности*

[00282] Репортерный анализ гена (RGA) CD112R человека/NFAT-люциферазы с клетками Jurkat выполняли, как в целом описано выше, для однотоочечного анализа на истощенных образцах надосадочной жидкости культур гибридомы или очищенных антител, которые последовательно 2 раза титровали в среде для анализа для определения окончательной эффективности панели антител. Результаты показаны на фигуре 11A, на которой представлен график индукции люциферазы NFAT, построенный в виде зависимости от log концентрации указанного антитела. Как показано на фигуре 11, все протестированные антитела демонстрируют эффективность в качестве антагонистов CD112R. Эффективность образцов надосадочной жидкости повторно истощенных культур гибридомы была очень близкой (в диапазоне от 1,3 до 3,5 нМ (фигура 11B)).

[00283] *Конструирование антител к CD112R с определением "горячих точек"*

[00284] Отобранные антитела к CD112R преобразовывали в стандартный формат антител подтипа IgG1 посредством слияния домена VL легких каппа-цепей с доменом Ск и доменов VH с последовательностью CH1-CH2-CH3. Домен CH2 из данного изотипа антитела конструировали для снижения эффекторной функции посредством включения мутации N297G и для улучшения термостабильности посредством сконструированной дисульфидной связи (R292C, V302C); данный изотип антитела обозначен как SEFL2-2. Антитела к CD112R дополнительно конструировали для удаления "горячих точек" или остатков, которые были предсказаны с помощью вычислительной техники или эмпирически определены как негативно влияющие на экспрессию, очистку, термостабильность, коллоидную стабильность, стабильность при длительном хранении, фармакокинетику in vivo и/или иммуногенность молекулы. Ряд аминокислотных мутаций в данных "горячих точках" разрабатывали на основании консервативности, ковариации, химического сходства, прогнозирования исходя из структурного моделирования и предыдущих сведений, полученных в ходе кампаний по разработке других антител. Разрабатывали сконструированные антитела, которые содержали как одиночные мутации, так и комбинации мутаций.

[00285] Сконструированные варианты клонировали посредством упорядочивания синтетических фрагментов ДНК, содержащих сконструированные переменные домены, и встраивания их с применением методов клонирования Golden Gate в стабильный вектор экспрессии млекопитающих, содержащий константные домены HC при отборе с пурамицином или константные домены LC при отборе с гигромицином. Антитела экспрессировали посредством котрансфекции клеток CHO-K1 с помощью HC и LC и отбора по стабильной экспрессии с использованием пурамицина и гигромицина. Антитела очищали посредством аффинной хроматографии на магнитных гранулах с применением

белка А AmMagTM (GenScript). Идентичность каждой молекулы подтверждали посредством интактной масс-спектрометрии. Для каждого варианта титр экспрессии в кондиционированной среде измеряли с помощью ForteBio Octet (Pall Life Sciences) с применением сенсоров с белком А. Процентную долю высокомолекулярного (% HMW) материала, присутствующего после аффинной хроматографии с применением белка А, измеряли посредством аналитической эксклюзионной хроматографии, и чистоту измеряли по % основного пика посредством микрокапиллярного электрофореза в невосстанавливающих условиях с применением LabChip GXII (Perkin Elmer). T_m первого перехода плавления (T_{m1}) и температуру начала агрегации (Tagg) измеряли посредством DSF с применением Prometheus (Nanotemper). Активность антител измеряли посредством репортерного анализа гена CD112R в клетках Jurkat, как описано выше, с усреднением двух независимых измерений. Результаты анализов сконструированных вариантов показаны ниже в таблице 2.

[00286] *Конструирование каркасов антител к CD112R*

[00287] Антитело 11E4 к CD112R (содержащее последовательность вариабельной области HC и последовательность вариабельной области LC под SEQ ID NO: 101 и 102 соответственно) конструировали для повышения возможности изготовления посредством прививания CDR каждого антитела на выбранные альтернативные человеческие каркасы с предпочтением к стабильным VH1, VH3, VH5, VK1 и VK3 зародышевого типа. Альтернативные каркасы отбирали с учетом сходства последовательностей. Последовательности до и после прививания тщательно исследовали, особенно в местах прививания, и в некоторых случаях разрабатывали целевые обратные мутации для обеспечения наилучших шансов на сохранение функциональной конформации петель CDR.

[00288] Сконструированные варианты каркасов клонировали посредством упорядочивания синтетических фрагментов ДНК, содержащих сконструированные вариабельные домены, и встраивания их с применением методов клонирования Golden Gate в стабильный вектор экспрессии млекопитающих, содержащий константные домены HC и LC, и очищали посредством аффинной хроматографии на магнитных гранулах AmMagTM с применением белка А (GenScript). Идентичность каждого варианта подтверждали посредством интактной масс-спектрометрии. Для каждого варианта титр экспрессии в кондиционированной среде измеряли с помощью ForteBio Octet (Pall Life Sciences) с применением сенсоров с белком А. Процентную долю высокомолекулярного (% HMW) материала, присутствующего после аффинной хроматографии с применением белка А, измеряли посредством аналитической эксклюзионной хроматографии, и чистоту измеряли по % основного пика посредством микрокапиллярного электрофореза в невосстанавливающих условиях с применением LabChip GXII (Perkin Elmer). T_m первого перехода плавления измеряли посредством DSF с применением Prometheus (Nanotemper). Очищенные образцы инкубировали при 40°C в течение 2 недель и определяли изменение % основного пика посредством аналитической эксклюзионной хроматографии.

Активность антител измеряли посредством репортерного анализа гена CD112R в клетках Jurkat, как описано выше, с усреднением двух независимых измерений. Результаты анализов сконструированных вариантов показаны в таблице 3.

[00289] *Разработка дрожжевого дисплея антител к CD112R*

[00290] Антитела 31B3, 11E4, 29E10, 1E1.016 и 24F1 к CD112R конструировали для повышения возможности изготовления и повышения связывания с CD112R посредством дрожжевого дисплея. При разработке библиотек для 11E4 и 1E1.016 использовали "прогулку" по CDR в трех повторностях по CDR таким образом, чтобы охватить все аминокислоты CDR, включая химические недостатки "горячих точек". Библиотеки для других 4 антител разрабатывали специально с учетом химических недостатков их "горячих точек" и остатков, которые предположительно способствуют ухудшению поверхностных свойств, определенных посредством моделирования гомологии и анализа участков посредством пакета программного обеспечения для компьютерного моделирования BioLuminate (Schrödinger, LLC, Нью-Йорк, штат Нью-Йорк, 2020 г.). Библиотеки подвергали сортировке с применением сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS) по высокому уровню связывания с конъюгированным с биотином рекомбинантным внеклеточным доменом (ECD) CD112R с применением стрептавидина PE в качестве вторичного флуоресцентного реагента. Варибельные домены, присутствующие в отсортированных пулах с двойным положительным результатом в отношении связывания/дисплея и пулов с положительным результатом в отношении дисплея, амплифицировали с праймерами, специфическими в отношении доменов FW1 и FW4 из HC и LC, и подвергали анализу посредством NGS на Illumina MiSeq для анализа 2x 300 п. о. Мутации отбирали после обработки данных посредством общепринятого частотного анализа, где соотношение показателей частоты для аминокислот с положительным результатом в отношении связывания делят на показатели частоты для аминокислот с положительным результатом в отношении дисплея, что затем нормализуют по соотношению для исходной последовательности. Последовательности, для которых показатели после обогащения превышали или были равными таковым для исходной последовательности, считали полезным или допустимым разнообразием и применяли для дополнительного рационального конструирования антитела после созревания аффинности. Для отбора по улучшенной аффинности конструировали новую библиотеку с шаффлингом цепей с применением последовательностей пулов связующих молекул из библиотек HC и LC, которые характеризовались связыванием, превышающим или равным исходному. Эти библиотеки затем обогащали в ходе 3 раундов последовательностями, которые сохраняли связывание с CD112R на клетках дрожжей при снижающихся концентрациях в каждом раунде. Отдельные клоны дрожжей затем анализировали в отношении связывания и секвенировали, в результате чего отбирали восстановленные варианты с созревшей аффинностью/плохими свойствами. Варианты клонировали в рекомбинантные системы экспрессии, как описано выше. Результаты анализов сконструированных вариантов показаны ниже в таблицах 4 и 5.

ПРИМЕР 4

[00291] В данном примере демонстрируются предварительные биохимические и функциональные эксперименты, проведенные для определения характеристик инструментальных антител к TIGIT.

[00292] Анализы конкурентного связывания рецептор-лиганд (RL) проводили в отношении антител к TIGIT 10A7 (антитело к TIGIT от Genentech) и MBSA43 (eBioscience™, кат. № 16-9500-85) с использованием клеток CHO-S, временно экспрессирующих TIGIT человека. Вкратце, клетки CHO-S, экспрессирующие TIGIT человека, смешивали с образцом антитела и инкубировали в течение 1 часа при 4°C в буфере для FACS (1X PBS, pH 7,4+2% эмбриональной бычьей сыворотки). Затем клетки со связанным образцом инкубировали с 2,5 мкг/мл huCD155-Fc-Alexa 647 (разработанного и меченного в собственной лаборатории) или 15 мкг/мл CD112-Fc-Alexa 647 (10005-H02H от Sino Biological; меченного в собственной лаборатории) в течение 45 минут при 4°C. Затем добавляли краситель 7-AAD (Sigma, кат. № A9400-5MG; 7,5 мкг/мл) для оценки жизнеспособности клеток и клетки инкубировали в течение еще 15 минут при 4°C, дважды промывали и ресуспендировали в буфере для FACS. Образцы анализировали с применением проточного цитометра BD Accuri™ и автоматического пробоотборника Intellicyt HyperCyt. Результаты показаны на фигурах 12A и 12B. На фигуре 12A представлен график % ингибирования связывания TIGIT с CD155-Fc, построенный в виде зависимости от концентрации инструментального антитела к TIGIT. На фигуре 12B представлен график % ингибирования связывания с CD112-Fc в виде зависимости от концентрации антитела. Результаты, показанные на фигурах 12A и 12B, демонстрируют, что инструментальные антитела 10A7 и MBSA43 ингибируют взаимодействия обоих CD155 и CD112 с TIGIT.

[00293] Проводили дополнительные анализы связывания для определения того, способны ли инструментальные антитела к TIGIT ингибировать связывающие взаимодействия между CD226 и CD155, эндогенно экспрессируемыми клетками 293T. Клетки 293T эндогенно экспрессируют высокие уровни CD155. Клетки 293T временно трансфицировали с помощью TIGIT человека (клетки TIGIT-293) или ложно трансфицировали (Mock-293 или Mock 293T). В отсутствие инструментальных антител к TIGIT блокируется связывание CD226 с эндогенным CD155 с помощью TIGIT, экспрессируемого клетками TIGIT-293, но не блокируется в контексте клеток Mock-293 (которые не характеризуются временной экспрессией TIGIT). В присутствии инструментальных антител к TIGIT TIGIT, экспрессируемый клетками TIGIT-293, связывается с инструментальными антителами и его связывание с CD155 блокируется, за счет чего обеспечивается взаимодействие CD226 с CD155. На фигуре 12C представлена схема анализа. Клетки TIGIT-293 или клетки Mock-293 смешивали с образцом антитела с CD226-Fc человека и без него при 10 мкг/мл (R&D, 666-DN) и инкубировали в течение 1 часа при 4°C в буфере для FACS (1X PBS, pH 7,4+2% эмбриональной бычьей сыворотки). Клетки 2X промывали буфером для FACS и затем инкубировали с козым антителом к

IgG-Fc, конъюгированным с Alexa (Jackson, 109-605-098) и 7-AAD (Sigma, 9400-5MG), в течение 15 минут при 4°C. Клетки 1X промывали буфером для FACS и ресуспендировали в буфере для FACS. Образцы анализировали с применением проточного цитометра BD Accuri™ и автоматического пробоотборника Intellicyt HyperCyt. Результаты показаны на фигурах 12D-12E. Данные на фигуре 12D демонстрируют, что huCD226 способен связывать клетки 293T Mock (незакрашенные кружки), эндогенно экспрессирующие huCD155. В присутствии сверхэкспрессируемого huTIGIT (закрашенные квадраты) цис-взаимодействие с huCD155 блокируется и связывания CD226 не происходит. На фигуре 12E показано, что обработка инструментальными антителами к TIGIT 10A7 (незакрашенные кружки) или MBSA43 (закрашенные квадраты) восстанавливает способность CD226 связываться с CD155, поскольку инструментальные антитела блокируют цис-взаимодействия TIGIT-CD155. Обработку клеток нерелевантным изотипическим контролем (полузакрашенные ромбы) осуществляли для демонстрации полной блокады связывания CD226 с CD155 (учитывая, что изотипический контроль не связывался с TIGIT). Данные подтверждают, что оба инструментальных антитела к TIGIT прерывают взаимодействия CD155-TIGIT, и что инструментальное антитело 10A7 более эффективно прерывает взаимодействия TIGIT-CD155.

[00294] Для определения функциональных эффектов инструментальных антител к TIGIT проводили анализы высвобождения IFN. В анализах высвобождения IFN измеряли уровень IFN γ , высвобождаемого первичными CD8⁺ Т-клетками памяти человека, стимулированными клетками-активаторами CHO-K1-huCD155. Результаты, показанные на фигуре 12F, демонстрируют, что только инструментальное антитело MBSA43 было способно индуцировать высвобождение IFN γ . В отличие от MBSA43, антитело 10A7 было неспособно активировать высвобождение IFN γ стимулированными Т-клетками.

[00295] Для определения функциональных эффектов инструментальных антител к TIGIT также проводили анализы активности люциферазы под контролем промотора IL-2. Т-клетки Jurkat стимулировали для контролируемой промотором IL-2 экспрессии репортерного гена люциферазы в присутствии инструментальных антител или сопоставимого по изотипу контрольного антитела клетками CHO, экспрессирующими CD155 человека и CD3-активатор. Результаты, показанные на фигуре 12G, согласуются с результатами на фигуре 12F в том, что только инструментальное антитело MBSA43 было способно связываться с TIGIT и блокировать взаимодействия CD155-TIGIT, что приводило к повторному проявлению явлений, индуцируемых активацией Т-клеток (например, высвобождению IFN, активации промотора IL-2).

[00296] Эти результаты демонстрируют, что оба инструментальных антитела к TIGIT, MBSA43 и 10A7, способны связываться с TIGIT и блокировать цис-взаимодействия TIGIT-CD155, но только инструментальное антитело MBSA43 было способно блокировать опосредованную TIGIT супрессию Т-клеток.

[00297] Инструментальные антитела к TIGIT тестировали в отношении их способности связывать TIGIT макака-крабоведа с использованием первичных Т-клеток

макака-крабоеда и TIGIT макака-крабоеда, временно экспрессируемого на клетках CHO и 293T. Клетки 293T, временно экспрессирующие TIGIT макака-крабоеда или только вектор, смешивали с образцом, содержащим инструментальное антитело MBSA43, 10A7 или 1F4 (антитело к TIGIT от Genentech), и инкубировали в течение 1 часа при 4°C в буфере для FACS. Клетки 2X промывали буфером для FACS и затем инкубировали с козьим (Gt) антителом к IgG-Fc человека, конъюгированным с Alexa-647, или козьим антителом к IgG-Fc мыши, конъюгированным с Alexa-647 (Jackson 115-605-071) и 7-AAD, в течение 15 минут при 4°C. Клетки 1X промывали буфером для FACS и ресуспендировали в буфере для FACS. Образцы анализировали с применением проточного цитометра BD Accuri™ и автоматического пробоотборника Intellicyt HyperCyt.

[00298] Результаты показаны на фигурах 12H и 12I. На фигуре 12H показано, что каждое из 1F4 (закрашенные кружки), 10A7 (закрашенные квадраты) и MBSA43 (закрашенные треугольники) связывает TIGIT макака-крабоеда, временно экспрессируемый в клетках 293T. Повышение разницы геометрической средней кратности по сравнению с контролем, представляющим собой только вектор, наблюдается при повышении концентрации антитела, в то время как с изотипическим контролем IgG связывание не наблюдается (незакрашенные ромбы). Однако только MBSA43 и 1F4 демонстрировали связывание с первичными активированными Т-клетками макака-крабоеда (фигура 12I). График FACS для 10A7 перекрывается с графиком FACS для антитела изотипического контроля, что свидетельствует о том, что 10A7 не связывается с первичными активированными Т-клетками макака-крабоеда (фигура 12I).

ПРИМЕР 5

[00299] В данном примере демонстрируется получение моноклональных антител (mAb) к TIGIT.

[00300] Генерирование иммунных ответов против TIGIT

[00301] Линии мышей и иммунизации

[00302] Полностью человеческие антитела к TIGIT человека получали посредством иммунизации трансгенных животных XENOMOUSE®, как в целом описано выше. Для этих иммунизаций применяли животных линий XMG4 и XMG2 XENOMOUSE®. Для генерирования иммунных ответов против TIGIT человека применяли несколько иммуногенов и путей иммунизации. Титры TIGIT-специфических антител в сыворотке крови отслеживали посредством FACS-анализа живых клеток на проточном цитометре Accuri (BD Biosciences) с применением временно трансфицированных клеток CHO в суспензии. Животных с наиболее высокими титрами антигенспецифических антител к TIGIT человека в сыворотке крови умерщвляли и использовали для получения гибридомы (Kohler and Milstein, 1975). Гибридомы получали, как в целом описано в примере 3.

[00303] Отбор антител, специфически связывающих TIGIT

[00304] Для идентификации и отбора антител к TIGIT человека использовали несколько скрининговых анализов (фигура 13).

[00305] Титры TIGIT-специфических антител в сыворотке крови контролировали посредством FACS-анализа живых клеток. Истощенные образцы надосадочной жидкости гибридомы тестировали в отношении связывания с TIGIT человека или макака-крабоеда, временно экспрессируемым в образцах CHO-S, и анализировали с применением проточного цитометра BD Accuri™ и автоматического пробоотборника Intellicyt HyperCyt или посредством Cell Insight. Для процедур скрининга на основе FACS клетки CHO-S временно трансфицировали конструкцией экспрессии млекопитающих, кодирующей TIGIT человека или яванского макака, с применением PEI MAX. Через 3 часа после трансфекции добавляли 5 мМ бутират натрия и инкубировали в течение 24 часов. На следующий день 15 мкл истощенной среды для гибридомы добавляли в каждую лунку 384-луночного планшета FMAT. Трансфицированные и ложно трансфицированные клетки CHO-S (всего 25000 клеток/лунка) смешивали с истощенным образцом гибридомы и инкубировали в течение 1 часа при 4°C в буфере для FACS. Через 1 час клетки 2X промывали буфером для FACS (1X PBS, pH 7,4+2% FBS) и затем инкубировали с козым антителом к IgG-Fc человека, конъюгированным с Alexa-647 (Jackson, 109-605-098), или с козым антителом к IgG-Fc мыши, конъюгированным с Alexa-647 (Jackson 115-605-071) и 7-AAD (Sigma, 9400-5MG), в течение 15 минут при 4°C. Клетки 1X промывали буфером для FACS и ресуспендировали в буфере для FACS. Образцы анализировали с применением проточного цитометра BD Accuri™ и автоматического пробоотборника Intellicyt HyperCyt. Для процедур скрининга изображений клетки CHO-S или HEK293T временно трансфицировали конструкцией экспрессии млекопитающих, кодирующей TIGIT, с применением PEI MAX или 293Fectin соответственно. На следующий день 15 мкл истощенной среды для гибридомы добавляли в каждую лунку 384-луночного планшета FMAT. Смешивали трансфицированные клетки (0,27 миллиона/мл), ядерный краситель Hoechst 33342 (7,5 мкг/мл) и вторичное антитело для выявления (0,75 мкг/мл - козые антитело к IgG человека (H+L), конъюгированное с Alexa 488 (Jackson ImmunoResearch)), и 30 мкл этой смеси добавляли в каждую лунку 384-луночного планшета FMAT. Через ~ 3 часа надосадочную жидкость аспирировали с применением планшет-ридера AquaMax, и 30 мкл буфера для FACS добавляли в каждую лунку с применением многоканального прибора. Планшеты помещали на встряхиватель для планшетов Big Bear для обеспечения равномерного распределения клеток в лунке и затем анализировали на платформе Cell Insight с применением Cell Health Bio-App.

[00306] С применением этих методик идентифицировали клетки гибридомы, продуцирующие антитело, специфическое в отношении TIGIT человека, как указано в таблице 6.

ТАБЛИЦА 6

Сбор	Антиген-специфические связывающие молекулы
1	89
2	288

4	904
5	708
6	608
7	684

[00307] *Репортерный анализ гена (RGA) TIGIT человека/IL-2-люциферазы с клетками Jurkat*

[00308] Для скрининга гибридом или очищенных антител к TIGIT, способных усиливать Т-клеточную активность посредством блокирования взаимодействия TIGIT-CD155, использовали репортерный анализ гена (RGA) IL-2 в клетках Jurkat. RGA был очень сходным с описанным в примере 2, за исключением того, что клетки Jurkat, стабильно экспрессирующие TIGIT человека (не CD112R) и репортер IL-2-люцифераза (Promega, кат. № CS191103A), культивировали в среде RPMI 1640 (Sigma), дополненной 10% эмбриональной бычьей сывороткой (Sigma), 2 mM L-глутамином (Sigma), 10 mM HEPES (Hyclone, GE Healthcare Life Sciences), 1X MEM NEAA (Sigma), 1X пируватом натрия (Sigma), 500 мкг/мл генетицина (Invitrogen) и 200 мкг/мл гигромицина В (Invitrogen). Линию репортерных клеток GloResponse™ IL-2-luc2P/TIGIT/Jurkat (Promega, кат. № CS191103A) стимулировали за счет активации Т-клеточного рецептора посредством совместного культивирования с клетками яичника китайского хомячка (CHO)-K1, стабильно экспрессирующими CD155 человека и активатор Т-клеток человека (Promega, кат. № CS191104A). 1×10^4 CHO-K1-CD155+ клеток высевали в белые 96-луночные планшеты с половинным объемом (Costar, кат. № 3688) в полной среде для выращивания, содержащей питательную смесь F12 HAM (Sigma), 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 10 mM HEPES, 500 мкг/мл генетицина и 200 мкг/мл гигромицина В, в течение ночи при 37°C/5% CO₂. На фигуре 14А показана схема RGA. После инкубации в течение ночи среду для выращивания заменяли на 5×10^4 клеток Jurkat, экспрессирующих IL-2Luc/TIGIT, в присутствии образцов надосадочной жидкости гибридом или антител с соответствующими контролями в среде для анализа (среда RPMI 1640, дополненная 1% эмбриональной бычьей сывороткой, 2 mM L-глутамином, 10 mM HEPES) и инкубировали при 37°C/5% CO₂ в течение 18 ч. Репортерный сигнал в каждой лунке определяли с применением системы анализа люциферазы Bio-Glo™ (Promega, кат. № G7940) в соответствии с рекомендацией производителя. Люминесценцию выявляли с применением планшет-ридера EnVision (Perkin Elmer).

[00309] Отбор активных антител показан на фигуре 14В. Как показано на фигуре 14В, антитела 43В7, 11А3, 39D2, 66Н9, 28В8, 55G7, 4G10 и 48В7 к TIGIT характеризовались лучшими свойствами, чем инструментальное антитело MBSA43. Эти антитела анализировали посредством процедур титрования для определения эффективности антител к TIGIT. Активность этих антител к TIGIT, определенная в RGA TIGIT человека/IL-2-люциферазы с клетками Jurkat, показана в таблице 7.

ТАБЛИЦА 7

ID Ab	Эффективность [нМ]	
	n=1	n=2
11A3	1,9	2,7
4G10	6,7	15,0
39D2	2,0	2,8
43B7	3,4	2,5
28B8	4,3	2,1
48B7	7,9	2,9
55G7	4,4	14,4
66H9	3,4	5,8

[00310] *Анализ функциональной блокировки TIGIT (анализ первичных Т-клеток)*

[00311] Для скрининга очищенных антител к TIGIT, способных усиливать Т-клеточную активность посредством блокирования взаимодействия TIGIT-CD155, использовали высвобождение IFN- γ из первичных CD8 Т-клеток памяти человека. CD8 Т-клетки памяти выделяли с использованием набора для обогащения Т-клеток памяти EasySep™ HumanCD8+ve (StemCell, кат. № 19159) из очищенных первичных Т-клеток человека (Biological Specialty Corp., кат. № 215-01-10) и предварительно стимулировали с применением 1 мкг/мл иммобилизованного антитела к CD3 (eBioscience, кат. № 16-0037) + 1 мкг/мл антитела к CD28 (BD PharMingen, кат. № 555725) + 10 нг/мл rhIL-2 (R & D Systems, кат. № 202-IL-050/CF) в течение 7 дней при 37°C/5% CO₂. 1×10^4 гамма-облученных клеток CHO-K1-CD155⁺ высевали в черные 96-луночные планшеты с половинным объемом (Costar, кат. № 3875) в полную среду для выращивания в течение ночи при 37°C/5% CO₂. После инкубации в течение ночи среду для выращивания заменяли на 5×10^3 CD8 Т-клеток памяти в присутствии серийно разбавленных антител с соответствующими контролями в ICM (среда для иммунных клеток: RPMI 1640, 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 10 mM HEPES, 2 mM L-глутамина, 1 X MEM NEAA, 1 X пируват натрия и 55 mM 2-меркаптоэтанола (Gibco)) и инкубировали при 37°C/5% CO₂ в течение 48 ч. Затем образцы надосадочной жидкости культуры тестировали в отношении уровня IFN- γ посредством гомогенной флуоресценции с временным разрешением (HTRF) в соответствии с инструкциями производителя (Cisbio, кат. № 62IFNPEC). Флуоресценцию выявляли с применением планшет-ридера EnVision (Perkin Elmer).

[00312] Результаты показаны на фигуре 14C. Антитела к TIGIT функционировали подобным образом или более эффективно, чем инструментальное антитело MBSA43. Активность антител 39D2, 43B7 и 28B8 к TIGIT в анализе первичных CD8 Т-клеток памяти составляла 380 пМ, 90 пМ и 160 пМ соответственно. Инструментальное антитело MBSA43 к TIGIT использовали в качестве контроля, и эффективность этого инструментального антитела составляла 1900 пМ.

[00313] *Анализ связывания первичных клеток с TIGIT*

[00314] Связывание образцов надосадочной жидкости гибридомы с TIGIT, экспрессируемым первичными клетками человека и яванского макака, тестировали посредством проточной цитометрии. Для анализа связывания первичных клеток человека очищенные Т-клетки человека (Biological Specialty Corp.) размораживали и суспендировали при концентрации $2,5 \times 10^6$ клеток/мл. Т-клетки стимулировали с помощью 5 мкг/мл клона ОКТ3 антитела к CD3 человека (eBioscience) и 1 мкг/мл антитела к CD28 человека (BD Pharmingen) в течение 72 часов при $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ в планшете, который был предварительно покрыт с помощью 5 мкг/мл антитела к Fc IgG мыши (Pierce). Через 72 часа клетки удаляли, промывали и суспендировали при концентрации $0,5 \times 10^6$ клеток/мл с 10 нг/мл IL-2 (Pepro Tech). Затем клетки инкубировали в течение еще 48-72 часов при $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$. Для анализа связывания первичных клеток яванского макака PBMC яванского макака (SNBL) размораживали и суспендировали при концентрации от 4×10^6 до 5×10^6 клеток/мл. PBMC стимулировали с помощью 1 мкг/мл клона SP34 антитела к CD3 человека (BD Pharmingen) и 1 мкг/мл антитела к CD28 человека (BD Pharmingen) в течение 72 часов при $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ в планшете, который был предварительно покрыт с помощью 5 мкг/мл антитела к Fc IgG мыши (Pierce). Через 72 часа клетки удаляли, промывали и суспендировали при концентрации $0,5 \times 10^6$ клеток/мл с 20 нг/мл IL-2 (Pepro Tech). Затем клетки инкубировали в течение еще 48-72 часов при $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$. После заключительного инкубирования клетки подготавливали для проточной цитометрии путем инкубирования с нормализованными образцами надосадочной жидкости культуры гибридомы, антителами положительного контроля и антителами изотипического контроля при конечной концентрации 1 мкг/мл. F(ab')²-фрагмент козьего антитела к IgG человека (H+L), конъюгированный с Alexa Fluor 647 AffiniPure (Jackson ImmunoResearch), при 5 мкг/мл применяли для выявления с помощью вторичного антитела, и 8,25 нМ YoPro1 (Invitrogen) применяли для окрашивания живых/мертвых клеток. Затем клетки анализировали на проточном цитометре BD FACSCanto II для выявления связывания антитела к TIGIT. Результаты выражены в виде геометрической средней кратности, определенной посредством FACS с применением клеток, экспрессирующих TIGIT, по сравнению со средним геометрическим значением изотипических контролей и с помощью "да" или "нет" для связывания (таблица 8).

ТАБЛИЦА 8

ID антитела	Первичные клетки макака-крабоеда (геометрическая средняя кратность, определенная посредством FACS)/связывающая молекула	Первичные клетки человека (геометрическая средняя кратность, определенная посредством FACS)/связывающая молекула
11A3	1,0/нет	11,6/да
4G10	1,2/нет	13,5/да

39D2	1,4/нет	13,7/да
43B7	4,7/да	13,7/да
28B8	0,90/нет	14,4/да
48B7	7,2/да	4,5/да
55G7	12,3/да	4,5/да
66H9	4,0/да	4,1/да

[00315] Как показано в таблице 8, только четыре антитела (43B7, 48B7, 55G7 и 66H9) связывались как с первичными клетками макака-крабоеда, так и с первичными клетками человека.

[00316] *Анализ конкурентного связывания рецептор-лиганд*

[00317] Затем образцы надосадочной жидкости гибридомы, связывающиеся с TIGIT, тестировали в отношении их способности блокировать TIGIT от связывающего лиганда. Анализы конкурентного связывания проводили на образцах надосадочной жидкости антиген-специфической гибридомы с применением FACS на клетках CHO-s, временно экспрессирующих TIGIT человека, следующим образом. Клетки CHO-S, экспрессирующие TIGIT человека, смешивали с образцом антител (образцами надосадочной жидкости гибридомы, специфическими в отношении TIGIT) и инкубировали в течение 1 часа при 4°C, а затем дважды промывали. Затем клетки со связанным образцом инкубировали с huCD155-Fc-Alexa 647 (разработанным и меченным в собственной лаборатории) или CD112-Fc-Alexa 647 (10005-H02H от Sino Biological; меченным в собственной лаборатории) в течение 45 минут при 4°C. Затем добавляли краситель 7-AAD для оценки жизнеспособности клеток и клетки инкубировали в течение еще 15 минут при 4°C, дважды промывали и ресуспендировали в буфере для FACS. Образцы анализировали с применением проточного цитометра BD Accuri™ и автоматического пробоотборника Intellicyt HyperCyt. Данные в таблице 9 отражают процентную долю ингибирования связывания CD155 или CD112 человека с TIGIT человека при 1,7 мкг/мл или 1 мкг/мл соответственно.

ТАБЛИЦА 9

ID антитела	Анализ рецептор CD155 - лиганд (% ингибирования)	Анализ рецептор CD112 - лиганд (% ингибирования)
11A3	100	100
4G10	100	91
39D2	100	100
43B7	100	100
28B8	100	97
48B7	99	88

55G7	99	86
66H9	98	85

[00318] *Определение аффинности TIGIT*

[00319] Определение аффинности mAb к TIGIT проводили с применением биосенсора OCTET. Человеческие mAb к TIGIT захватывали с применением наконечников для захвата с антителом к FC huIgG (АНС) для определения кинетики (кат. № 18-5060) при 2 мкг/мл. Мышиное контрольное mAb MBSA43 к TIGIT (кат. № 16-9500-85) захватывали на наконечниках для захвата с антителом к Fc IgG мыши при 2 мкг/мл. Связывание как huTIGIT (PL44403), так и супоTIGIT (PL40461) оценивали посредством 2-кратного титрования белков от начальной концентрации, составляющей 200 нМ или 100 нМ, со снижением до 3 нМ. Поскольку huTIGIT содержит метку моно-Fc, для блокирования реагента для захвата, представляющего собой антитело к Fc, на наконечниках Octet использовали стадию блокирования, предусматривающую применение 50 мкг/мл нерелевантного IgG2. Для определения аффинности huTIGIT ассоциацию отслеживали в течение 5 мин, а диссоциацию отслеживали в течение 20 минут. В случае супоTIGIT ассоциацию отслеживали в течение 5 мин и диссоциацию отслеживали в течение 5 минут. Буфер для анализа, используемый в этих экспериментах, представлял собой 10 мМ Tris, 150 мМ NaCl, 1 мМ CaCl₂, 0,1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (BSA), 0,13% Triton X-100, pH 7,6. Данные в таблице 10 представляют значения относительной аффинности mAb к TIGIT в отношении TIGIT человека или яванского макака. Вследствие очень слабого соответствия значения 2 mAb к супоTIGIT не были представлены. Предел выявления диссоциации составляет 4e-5 на основании как минимум 5% диссоциации в течение 20 минут.

ТАБЛИЦА 10

ID антитела	Аффинность к TIGIT человека	Аффинность к TIGIT макака-крабеда
11A3	< 100 пМ	NB
4G10	< 200 пМ	39 нМ
39D2	< 100 пМ	43 нМ
43B7	< 100 пМ	13 нМ
28B8	< 100 пМ	NB
48B7	< 100 пМ	38 нМ
55G7	< 100 пМ	17 нМ
66H9	< 100 пМ	18 нМ
MBSA43	< 200 пМ	< 100 пМ

NB=связывание отсутствует

[00320] Как показано в таблице 10, каждое из антител демонстрировало высокую

аффинность к TIGIT человека, и большинство демонстрировало высокую аффинность к TIGIT макака-крабоведа.

[00321] *Отбор антител к TIGIT*

[00322] Результаты скрининговых анализов, описанных выше и на фигуре 13, приводили к идентификации менее 10 уникальных антител, включая 4G10, 11A3, 28B8, 43B7, 66H9, 39D2 и 55G7. Такие антитела демонстрировали антагонистическую функцию, как определено посредством RGA с клетками Jurkat, и антигенсвязывающую активность, как определено посредством анализов связывания первичных клеток человека и макака-крабоведа, и поэтому эти антитела передавали для последующих процедур скрининга характеристик, секвенирования и определения аффинности. Эти антитела к TIGIT были среди тех, которые были более эффективными, чем инструментальные антитела MBSA43 и 10A7 к TIGIT. Сравнение выбранных антител к TIGIT и инструментальных антител представлено в таблице 11. Как показано в этой таблице и подтверждается фигурами 14A и 14B, выбранные антитела к TIGIT демонстрировали лучшую активность по сравнению с инструментальными антителами.

ТАБЛИЦА 11

	MBSA43	10A7	Выбранные антитела к TIGIT
Блокатор CD155	Да	Да	Да
Блокатор CD112	Да	Да	Да
Активны в RGA с клетками Jurkat	Да	Нет	Да*
Активны в анализе CD8 T-клеток памяти	Да	Нет	Да*
Молекула, связывающая TIGIT человека на первичных клетках	Да	Да	Да
Молекула, связывающая TIGIT макака-крабоведа на первичных клетках	Да	Нет	Да*

* Активность лучше, чем у инструментального антитела MBSA43

[00323] *Молекулярное выделение и секвенирование антител к TIGIT*

[00324] Молекулярное секвенирование тяжелых и легких цепей выбранных антител к TIGIT выполняли, как в целом описано в примере 3, за исключением того, что РНК (общую или мРНК) очищали из лунок, содержащих клетки гибридомы, продуцирующие антагонистическое антитело к TIGIT.

[00325] *Конструирование антител к TIGIT с определением "горячих точек"*

[00326] Выбранные антитела к TIGIT из кампании XenoMouse конструировали для удаления "горячих точек" или остатков, которые были предсказаны с помощью вычислительной техники или эмпирически определены как негативно влияющие на экспрессию, очистку, термостабильность, коллоидную стабильность, стабильность при длительном хранении, фармакокинетику in vivo и/или иммуногенность молекулы, как в

целом описано в примере 3.

[00327] Сконструированные варианты с определенными горячими точками клонировали, временно экспрессировали посредством котрансфекции клеток ExpiCHO (Life Technologies) с помощью HC и LC и очищали посредством аффинной хроматографии с применением белка A. Активность антител измеряли посредством репортерного анализа гена TIGIT с клетками Jurkat, как описано выше. Результаты анализов сконструированных вариантов показаны ниже в таблице 12.

[00328] *Прививание каркасов на антитела к TIGIT*

[00329] Антитела к TIGIT 55G7.041 (содержащее последовательность варибельной области LC и последовательность варибельной области HC под SEQ ID NO: 1923 и 1924 соответственно), 66H9.009 (содержащее последовательность варибельной области HC и последовательность варибельной области LC под SEQ ID NO: 221 и 222 соответственно), 43B7.002.015 (содержащее последовательность варибельной области HC и последовательность варибельной области LC под SEQ ID NO: 201 и 202 соответственно) и 58A7.003.008 (содержащее последовательность варибельной области HC и последовательность варибельной области LC под SEQ ID NO: 211 и 212 соответственно) конструировали для повышения возможности изготовления посредством прививания CDR каждого антитела на выбранные альтернативные человеческие каркасы с предпочтением стабильных VH1, VH3, VH5, VK1, VK3 и VL2 зародышевого типа. Альтернативные каркасы для каждой исходной молекулы отбирали с учетом сходства последовательностей. В каждом случае последовательности до и после привития тщательно исследовали, особенно в местах привития, и в некоторых случаях разрабатывали целевые обратные мутации для обеспечения наилучших шансов на сохранение функциональной конформации петель CDR.

[00330] Сконструированные варианты каркасов клонировали посредством упорядочивания синтетических фрагментов ДНК, содержащих сконструированные варибельные домены, и встраивания их с применением методов клонирования Golden Gate в стабильный вектор экспрессии млекопитающих, содержащий константные домены HC или LC. Антитела экспрессировали посредством котрансфекции клеток CHO-K1 с помощью HC и LC и очищали посредством аффинной хроматографии на смоле MabSelect SuRe с применением белка A (GE Healthcare Life Sciences). Идентичность каждого варианта подтверждали посредством интактной масс-спектрометрии. Для каждого варианта титр экспрессии в кондиционированной среде измеряли с помощью ForteBio Octet (Pall Life Sciences) с применением сенсоров с белком A. Процентную долю высокомолекулярного (% HMW) материала, присутствующего после аффинной хроматографии с применением белка A, измеряли посредством аналитической эксклюзионной хроматографии, и чистоту измеряли по % основного пика посредством микрокапиллярного электрофореза в невозстанавливающих условиях с применением LabChip GXII (Perkin Elmer). Tm первого перехода плавления измеряли посредством DSF

с применением Prometheus (Nanotemper). Очищенные образцы инкубировали при 40°C в течение 2 недель и определяли изменение % основного пика посредством аналитической эксклюзионной хроматографии. Активность антител измеряли посредством репортерного анализа гена TIGIT в клетках Jurkat, как описано выше, с усреднением двух независимых измерений. Результаты анализов сконструированных вариантов показаны ниже в таблице 13.

[00331] *Оптимизация дрожжевого дисплея антител к TIGIT*

[00332] Антитела к TIGIT 43B7.002.015 (содержащее последовательность варибельной области HC и последовательность варибельной области LC под SEQ ID NO: 201 и 202 соответственно) и 58A7.003.008 (содержащее последовательность варибельной области HC и последовательность варибельной области LC под SEQ ID NO: 211 и 212 соответственно) разрабатывали для улучшения возможности изготовления и повышения связывания с TIGIT посредством дрожжевого дисплея. Для каждого антитела были получены библиотеки, в которых каждую возможную смежную пару остатков во всех шести CDR одновременно подвергали мутации с получением всех возможных аминокислот посредством применения вырожденных кодонов NNK. Библиотеки отображались на поверхности производного дрожжей BJ5464, где домен Fd был слит с N-концом альфа-агглютина и LC не была слита с поверхностью дрожжей. Эффективность дисплея измеряли посредством связывания антитела к Fab, конъюгированного с Alexafluor 647. Библиотеки подвергали сортировке с применением сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS) по высокому уровню связывания с конъюгированным с биотином рекомбинантным внеклеточным доменом (ECD) TIGIT с применением стрептавидина PE в качестве вторичного флуоресцентного реагента. Варибельные домены, присутствующие в отсортированных пулах с двойным положительным результатом в отношении связывания/дисплея и пулов с положительным результатом в отношении дисплея, амплифицировали с праймерами, специфическими в отношении доменов FW1 и FW4 из HC и LC, и подвергали анализу посредством NGS на Illumina MiSeq для анализа 2x 300 п. о. Мутации отбирали после обработки данных посредством общепринятого частотного анализа, где соотношение показателей частоты для аминокислот с положительным результатом в отношении связывания делят на показатели частоты для аминокислот с положительным результатом в отношении дисплея, что затем нормализуют по соотношению для исходной последовательности. Последовательности, для которых показатели после обогащения превышали или были равными таковым для исходной последовательности, считали полезным или допустимым разнообразием и применяли для дополнительного рационального конструирования антитела после созревания аффинности.

[00333] Библиотеки дрожжевого дисплея с созревшей аффинностью для каждой HC и LC разрабатывали с использованием комбинации структурной инженерии (58A7.003.008) и модельной инженерии пар, находящихся в непосредственной близости (43B7.002.015), а также библиотек для сканирования CDR с применением NNK

(43B7.002.015 и 58A7.003.008). После того, как эти библиотеки НС или LC сортировали по связыванию TIGIT, равному или большему, чем исходное, 4 библиотеки комбинировали в библиотеку с шаффлингом цепей. В данном документе все разработанные библиотеки смешивали вместе для избегания зависимости от подходов к разработке. Библиотеки отображали на поверхности дрожжей, как описано выше, и подвергали сортировке по высокому связыванию с меченным биотином рекомбинантным ECD TIGIT в условиях с возрастающей жесткостью в каждом последующем раунде. Клоны с высоким связыванием отбирали и подвергали скринингу как отдельные клоны и клоны с наиболее высокими соотношениями связывание/отображение отбирали для секвенирования. Вариабельные домены амплифицировали с использованием праймеров к вектору и константному домену и ПЦР-продукты подвергали секвенированию по Сэнгеру. Последовательности, которые вносили химические недостатки, исключали из разработки панели. Химические недостатки и участки поверхности с зарядом, идентифицированные с помощью пакета для моделирования BioLuminate (Schrödinger, LLC), подвергали мутации с использованием информации из данных сортировки по обогащению NGS, описанных выше. Конечные сконструированные последовательности отбирали для дальнейшего определения характеристик в качестве рекомбинантных экспрессируемых моноклональных антител.

[00334] Наиболее перспективные варианты, сконструированные посредством дисплея, клонировали посредством упорядочивания синтетических фрагментов ДНК, содержащих сконструированные вариабельные домены, и встраивания их с применением методов клонирования Golden Gate в стабильный вектор экспрессии млекопитающих, содержащий константные домены НС при отборе с пурамицином или константные домены LC при отборе с гигромицином. Антитела экспрессировали посредством котрансфекции клеток CHO-K1 с помощью НС и LC и отбора по стабильной экспрессии с использованием пурамицина и гигромицина. Антитела очищали посредством аффинной хроматографии на магнитных гранулах с применением белка A AmMag™ (GenScript). Идентичность каждой молекулы подтверждали посредством интактной масс-спектрометрии. Процентную долю высокомолекулярного (% HMW) материала, присутствующего после аффинной хроматографии с применением белка А, измеряли посредством аналитической эксклюзионной хроматографии, и чистоту измеряли по % основного пика посредством микрокапиллярного электрофореза в невозстанавливающих условиях с применением LabChip GXII (Perkin Elmer). Активность антител измеряли посредством репортерного анализа гена TIGIT с клетками Jurkat, как описано выше. Результаты анализов сконструированных вариантов показаны ниже в таблицах 14 и 15.

[00335] *Функция сконструированных антител к TIGIT и инструментальных антител*

[00336] Т-клетки Jurkat, экспрессирующие TIGIT и конструкцию IL-2-люцифераза, модифицировали с использованием CRISPR для нокаута (КО) экспрессии CD226. Эти клетки с КО использовали в RGA с клетками Jurkat и сравнивали с CD226-

экспрессирующими клетками Jurkat, экспрессирующими TIGIT и конструкцию IL-2-люцифераза. Клетки Jurkat культивировали вместе с CHO-K1-CD155+ клетками, как описано в данном документе, и измеряли активность люциферазы. Антитела, использованные в этом эксперименте, включали инструментальное антитело MBSA43 и сконструированные антитела к TIGIT (описанные выше) AB1 (43B7.002.015) и AB2 (66H9.010).

[00337] Результаты показаны на фигуре 15. Как показано на фигуре 15, нокаутирование CD266 приводило к значительному снижению макс. активности (незакрашенные символы по сравнению с закрашенными символами). Эти данные подтверждают, что антитела к TIGIT блокируют цис-взаимодействия TIGIT-CD226 для предотвращения опосредованного TIGIT-CD226 подавления сигнала. Эти данные также подтверждают, что участие CD226 способствует более сильному ответу TCR. В присутствии CD226 mAb AB1 и AB2 к TIGIT (закрашенные кружки и закрашенные квадраты соответственно) блокируют взаимодействия TIGIT-CD226 более эффективно, чем MBSA43 (закрашенные ромбы), поскольку максимальная активность полностью не достигается. При нокауте CD226 AB1, AB2 и MABSA43 сходным образом блокируют взаимодействия TIGIT-CD155.

ПРИМЕР 6

[00338] В данном примере демонстрируются значения аффинности связывания выбранных антител по настоящему изобретению.

[00339] Связывание антител к TIGIT с TIGIT человека под SEQ ID NO: 1 и TIGIT яванского макака под SEQ ID NO: 2024 и связывание антител к CD112R с CD112R человека под SEQ ID NO: 3 и CD112R (N81D) под SEQ ID NO: 2026 характеризовали на Biacore T200 с применением технологии поверхностного плазмонного резонанса (SPR). В частности, антитело к Fab человека из набора для захвата Fab (GE Healthcare Life Sciences) подвергали иммобилизации на всех четырех проточных ячейках чипа CM5 до примерно 6000-9000 RU с использованием стандартных реагентов для сочетания по аминокислоте (GE Healthcare Life Sciences). PBS плюс 0,005% P20 использовали в качестве вспомогательного буфера для анализа во всех анализах. Первую проточную ячейку, содержащую только иммобилизованное антитело к Fab человека, использовали в качестве фонового контроля. Антитела к TIGIT или к CD112R захватывали на второй, третьей и четвертой проточных ячейках до примерно 100-190 RU. TIGIT человека и яванского макака, CD112R человека и CD112R (N81D) в диапазоне концентраций от 0,78 до 100 нМ разбавляли буфером для образцов (PBS плюс 0,1 мг/мл BSA, 0,005% P20) и вводили на поверхности с захваченным антителом в течение 180 секунд ассоциации и 300 секунд диссоциации при 50 мкл/мин. В конце диссоциации поверхности с антителом к Fab регенерировали с использованием 10 mM глицина, pH 2,1.

[00340] Данные по связыванию антител к TIGIT с TIGIT человека и яванского макака, антител к CD112R с CD112R человека и CD112R (N81D) анализировали с применением программного обеспечения для оценки Biacore T200 3.0 (GE Healthcare Life

Sciences). Все данные дважды соотносили с эталоном посредством вычитания контрольной поверхности без антитела и цикла без антитела, при котором вводили только буфер для образцов. Для связывания антител к TIGIT с TIGIT человека и антител к CD112R с CD112R человека и CD112R (N81D) скорость ассоциации (k_a), скорость диссоциации (k_d), равновесную константу диссоциации (K_D) и ответ с максимальным связыванием (R_{max}) рассчитывали на основании глобальной аппроксимации с использованием кинетической модели связывания 1:1. Для связывания антител к TIGIT яванского макака K_D и R_{max} рассчитывали на основании глобальных аппроксимаций с использованием модели связывания в равновесном состоянии 1:1. Характеристики связывания TIGIT человека показаны в таблице 16. Характеристики связывания TIGIT яванского макака показаны в таблице 17. Данные по связыванию CD112R человека показаны в таблице 18 и характеристики связывания CD112R человека (N81D) показаны в таблице 19.

ПРИМЕР 7

[00341] В данном примере демонстрируется, что комбинированная блокада CD112R, TIGIT и PD-1 приводит к увеличению временной продолжительности Т-клеточного ответа.

[00342] Для оценки эффектов комбинированной блокады CD112R и TIGIT получали клетки CHO K1, которые экспрессируют как CD112, так и CD155. Клетки приводили в контакт с Т-клетками, и ожидалось, что активация TCR этих клеток приведет к высвобождению IFN-гамма только тогда, когда взаимодействие TIGIT-CD155 и взаимодействие CD112R-CD112 будут заблокированы. Схема системы анализа клеток показана на фигуре 16A. Тестировали три различных антитела к TIGIT (43B7.002.015, 66H9.009 и 58A7.002.008), и они демонстрировали умеренный эффект в качестве отдельных средств, но при применении в комбинации с антителом, блокирующим CD112R, в данном анализе Т-клеточная активность была значительно усилена (фигура 16B).

[00343] Кроме того, блокаду CD112R и TIGIT смесями антител 1:1 сравнивали с блокадой биспецифическим антителом (bsAb), где в данном анализе оба антитела присутствовали в формате IgG-scFv. Эффекты смесей моноклональных антител в отношении Т-клеточной активности показаны в таблице 20. Эти эффекты в отношении Т-клеточной активности были сопоставимы с эффектами, достигаемыми с помощью bsAb, что свидетельствует о том, что эти рецепторы независимо способствуют Т-клеточной активации (данные по bsAb не показаны).

ТАБЛИЦА 20

Клоны антител из смеси mAb	Среднее значение EC50 (нМ)	Кратность по сравнению с исходным уровнем при макс. значении
29E10 и 43B7.002.015	0,16 ($\pm$ 0,1)	2,24 ($\pm$ 0,27)

24F1 и 43B7.002.015	0,15 ($\pm 0,012$)	2,75 ($\pm 0,28$)
11E4 и 43B7.002.015	0,40 ($\pm 0,3$)	3,27 ($\pm 0,3$)

Стандартное отклонение указано в (); n=3

[00344] Активность двойной блокады двух TIGIT, CD112R, а также PD-1 по сравнению с тройной блокадой (блокадой всех трех TIGIT, CD112R и PD-1) оценивали в антиген-специфическом анализе CTL с использованием активированных пептидом опухолевых клеток SK-MEL в качестве антигенпредставляющих клеток (APC). Специфический для пептида pp65 ответ CTL на активированные пептидом опухолевые клетки в случае двойной блокады PD-1 и TIGIT, тройной блокады (3х), одиночной блокады TIGIT и одиночной блокады PD-1 показан на фигуре 17A. Специфический для пептида pp65 ответ CTL на активированные пептидом опухолевые клетки в случае двойной блокады CD112R и TIGIT, тройной блокады (3х), одиночной блокады TIGIT и одиночной блокады CD112R показан на фигуре 17B. Специфический для пептида pp65 ответ CTL на активированные пептидом опухолевые клетки в случае двойной блокады PD-1 и CD112R, тройной блокады (3х), одиночной блокады CD112R и одиночной блокады PD-1 показан на фигуре 17C. Ожидаемые и наблюдаемые исходы показаны на фигуре 17D.

[00345] Как показано на фигурах 17A-17C, специфический для пептида pp65 ответ CTL на активированные пептидом опухолевые клетки был незначительно усилен при одиночной блокаде TIGIT, CD112R или PD-1 (относительно изотипического контроля), и каждый случай двойной блокады (TIGIT+CD112R, TIGIT+PD-1, CD112R+PD-1) дополнительно усиливал специфический для пептида pp65 ответ CTL. На каждой из фигур 17A-17C тройная блокада демонстрировала наиболее значительное повышение Т-клеточной активности против опухолевых клеток. Были ли ответы при различных комбинациях представлены строго аддитивными или синергическими эффектами оценивали посредством сравнения рассчитанной ожидаемой и наблюдаемой временной продолжительности усиления в данном анализе (фигура 17D), и было обнаружено, что в то время как эффекты TIGIT+PD-1 или комбинации CD112R+PD-1 были аддитивными, эффект тройной блокады TIGIT+CD112R+PD-1 был синергическим (фигура 17D).

ПРИМЕР 8

[00346] В данном примере демонстрируется, что тройная блокада усиливает Т/НК-клеточный ответ в культурах первичных опухолевых клеток человека.

[00347] Эффект одиночной блокады, двойной блокады и тройной блокады в отношении TIL тестировали посредством обработки диссоциированных опухолевых клеток человека (с сопутствующими TIL) антителом к PD-1 (ниволумаб, "Nivo"), антителом к CD112R (24F1) или антителом к TIGIT (43B7.002.015) и комбинациями двух или трех из этих антител, а также посредством измерения ответа TIL, представленного продуцированием IFN γ . В качестве контроля использовали антитело, сопоставимое по изотипу. Измерения проводили в дни 3 и 6, и результаты показаны на фигуре 17E.

[00348] Как показано на фигуре 17E, продуцирование IFN γ было выше в день 3 по сравнению с днем 6. Тройная блокада антителами Nivo+43B7.002.015+24F1 индуцировала наиболее высокие уровни продуцирования IFN γ как в день 3, так и в день 6 по сравнению с одиночной и двойной блокадой. Эти результаты свидетельствуют о том, что в первичных TIL, экспрессирующих относительно низкие уровни этих рецепторов контрольных точек (фигуры 17F и 17G), обработка тройной комбинацией индуцировала значительное усиление активности TIL. Интересно, что было замечено, что TIL, которые были обработаны антителом к α -PD-1, характеризовались повышенной экспрессией TIGIT (фигура 17H), в то время как TIL, обработанные антителом к α -TIGIT, характеризовались повышенной экспрессией PD-1 к концу периода культивирования (фигура 17I). Этот профиль экспрессии согласуется с опубликованными отчетами по данным из сходных анализов Т-клеток *in vitro* и у пациентов, подвергавшихся лечению α -PD-1, что свидетельствует о том, что тройная блокада будет эффективной для повышения Т-клеточных ответов у пациентов.

ПРИМЕР 9

[00349] В данном примере представлено обсуждение результатов из примеров 1, 2, 7 и 8.

[00350] CD112R и TIGIT главным образом взаимодействуют с CD112 и CD155 соответственно и подавляют Т- и NK-клеточный ответ на опухолевые клетки. Авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что опухолевые клетки экспрессируют высокие уровни обоих лигандов, и, следовательно, ингибирование как CD112R, так и TIGIT, вероятно, необходимо для эффективного взаимодействия с CD226, что приводит к усилению Т/NK-клеточной активности.

[00351] Авторы настоящего изобретения разработали композицию, содержащую совместно составленные смеси моноклональных антител, которые одновременно блокировали CD112R и TIGIT. Композиция была так же эффективна, как два моноклональных антитела, представленные в формате биспецифической молекулы. Оба способа воздействия приводили к значительному усилению активности первичных Т-клеток человека в анализах *in vitro* и общие уровни активности были сопоставимыми. Кроме того, тройная блокада с использованием моноклональных антител к CD112R и TIGIT в комбинации с блокирующим PD-1 антителом дополнительно усиливала Т-клеточную активность, лучше, чем любые одиночные или двойные комбинации из трех.

[00352] Совместная блокада CD112R и TIGIT представляет собой перспективный подход для комбинированного лечения, направленного на PD-1/PD-L1, поскольку тройная блокада может включать два избыточных костимулирующих пути для усиления Т/NK-клеточной активности. Результатом может быть повышение эффективности по сравнению с монотерапией, направленной на PD-1/L1, и, что важно, сниженная вероятность или преодоление резистентности опухоли к монотерапии, как это наблюдается у пациентов, рефрактерных к лечению, направленному на PD-1/L1.

ПРИМЕР 10

[00353] В данном примере описаны материалы и способы, применяемые в экспериментах из примеров 1-2 и 7-8.

[00354] Построение графика корреляции TCGA в Array Studio

[00355] Логарифмические значения (FPKM), представляющие уровни транскриптов генов, представляющих интерес, получали из набора данных TCGA и наносили на диаграммы рассеяния для демонстрации парной корреляции. Анализ проводили в отношении рецепторов семейства TIGIT и PD-1 и их лигандов для показаний, представляющих собой ряд видов рака.

[00356] Анализ данных секвенирования РНК отдельных клеток

[00357] Ранее был описан анализ секвенирования РНК отдельных Т-клеток, выделенных от пяти пациентов-людей с гепатоцеллюлярной карциномой (Zheng et al., 2017). Этот набор данных анализировали в отношении генов, представляющих интерес, и с применением Tamatoa создавали 2D-графики и коробчатые диаграммы. В частности, исследовали экспрессию TIGIT, CD112R, CD226 и PD-1 на Т-клетках из опухолевых тканей.

[00358] Анализ связывания CD112R и FACS-окрашивание

[00359] Для оценки связывания инструментальных антител к CD112R (PL-52576, PL-52575, PL-52577) с CD112R человека клетки CHO K1, трансфицированные для экспрессии CD112R, инкубировали с антителом к CD112R, Fc к лиганду CD112 (Sinobiology) или изотипическим контролем в течение 1 часа при 4С и связанное антитело выявляли с помощью конъюгированного с APC вторичного антитела к IgG человека (R&D systems) или конъюгированного с PE вторичного антитела к IgG мыши (Jackson Immunoresearch).

[00360] Для определения характеристик экспрессии CD112R, PD-1 и экспрессии TIGIT посредством проточной цитометрии предварительно активированные Т-клетки или диссоциированные опухолевые клетки блокировали реагентом, блокирующим Fc (10 мин при комнатной температуре), и инкубировали с конъюгированными с флуорохромом антителами в течение 45 мин при 4С. Для выявления CD112R на второй стадии добавляли конъюгированное с PE вторичное антитело к IgG человека (Jackson Immunoresearch). В некоторых случаях клетки фиксировали с использованием буфера для фиксации IC (ebioscience). Данные получали с применением проточного цитометра BD Symphony и анализировали с применением программного обеспечения FlowJo.

[00361] Активация и размножение первичных Т-клеток человека

[00362] Пан-Т-клетки и CD8 Т-клетки памяти очищали от предварительно замороженных PBMC (Cepheus Bioscience) с применением наборов для выделения пан-Т-клеток человека (miltenyi Biotec) и CD8 Т-клеток памяти (STEMCELL technologies) на основе магнитных гранул с применением протокола, рекомендованного производителями. Пан-Т-клетки культивировали с гранулами Dynabeads с антителами к CD3/CD28 человека (Life Technologies) при соотношении 1:1 в присутствии 50 МЕ/мл рекомбинантного человеческого IL2 (R&D systems) в течение 3 дней, а затем, после удаления

активирующих гранул, оставляли на 3 дня без дополнительного IL2. CD8 Т-клетки памяти культивировали с гранулами Dynabeads с антителами к CD3/CD28 человека (Life Technologies) при соотношении 1:1 в присутствии 50 МЕ/мл рекомбинантного человеческого IL2 (R&D systems) в течение 7 дней, IL2 пополняли один раз в 2-3 дня, а затем, после удаления активирующих гранул, оставляли на 2 дня в присутствии 50 МЕ/мл рекомбинантного IL2. Для размножения CD8⁺ Т-клеток, реактивных в отношении CMVpp65₍₄₉₅₋₅₀₃₎, PBMC от доноров HLA-A2⁺, CD8⁺ клеток, реактивных в отношении CMVpp65₍₄₉₅₋₅₀₃₎, культивировали с дендритными клетками, полученными из моноцитов, активированных пептидом CMVpp65₍₄₉₅₋₅₀₃₎ (Anaspec), полученными с применением набора для дифференцировки полученных из моноцитов дендритных клеток (R&D Systems), в присутствии 50 МЕ/мл рекомбинантного IL2 (R&D Systems), 10 нг/мл рекомбинантного IL7 (R&D System), 1000 МЕ/мл рекомбинантного IL4 (R&D systems) в течение 14 дней во флаконе Grex-10 (производства Wilson Wolf). Среда, используемая для культивирования и размножения Т-клеток, представляет собой полную среду RPMI (RPMI 1640, дополненную с помощью Glutamax (GIBCO) + 10% FBS (GIBCO) + Pen/strep+NEAA+пируват натрия+β-ME+HEPES (GIBCO)).

[00363] Получение сконструированных клеток CHO

[00364] Линию клеток CHO K1, экспрессирующую scfv к CD3 (полученную из внутренних источников Amgen), использовали для трансфекции с целью индукции экспрессии CD112 и CD155. Линию клеток CHO, экспрессирующую scfv к CD3 на "низком" уровне, трансфицировали вектором pcDNA3.1_human CD112 var delta_zeo (полученным из внутреннего источника Amgen) с применением набора для трансфекции с липофектами 2000 (Invitrogen) с использованием протокола, рекомендованного производителем. После трансфекции клетки CHO, экспрессирующие CD112, сортировали в виде клонов одиночных клеток и обеспечивали их рост в среде для отбора (среда Хэма F12, содержащая (GIBCO) 1X glutamax (GIBCO), 10% инактивированной нагреванием FBS (GIBCO), 200 мкг/мл гигромицина и 100 мкг/мл зеоцина и (Thermo Fischer)). Для получения клеток CHO, экспрессирующих оба CD112, CD155, а также scfv к CD3, ранее полученную клеточную линию CHO, экспрессирующую scfv к CD3 и CD112, трансфицировали вектором pcDNA3.2_human CD155 var 1_puro (полученным из внутреннего источника Amgen) с использованием липофектамина 2000 (Invitrogen). После трансфекции клетки CHO, экспрессирующие CD112, scfv к CD3 и CD155, сортировали по клонам одиночных клеток и обеспечивали их размножение в среде для отбора (среда Хэма F12, содержащая (GIBCO) 1X glutamax (GIBCO), 10% инактивированной нагреванием FBS (GIBCO), 200 мкг/мл гигромицина, 15 мкг/мл пурамицина и 100 мкг/мл зеоцина и (Thermo Fischer)). Для получения линии клеток CHO K1, экспрессирующей CD112R человека, клетки CHO K1 трансфицировали вектором pMSCV_FLAG_human CD112R (N81D)(41-326)_IRES_EGFP с помощью набора с липофектами 2000 (Invitrogen) с использованием протокола, рекомендованного производителем.

[00365] Анализы первичных клеток in vitro

[00366] Для исследования эффекта блокирования взаимодействия CD112R-CD112 и CD226-CD112 в отношении Т-клеточной функции клетки CHO, либо трансфицированные для экспрессии CD112, либо трансфицированные вектором без вставки вместе с scfv к CD3, культивировали совместно с ранее размноженными пан-Т-клетками и растворимым антителом к CD28 (Biolegend) в присутствии антитела к CD112R или изотипического контроля, с антителом к CD226 или без него (Abcam). Надосадочную жидкость культуры клеток собирали через 24 часа и оценивали в отношении IL2 с применением стандартного набора для ELISA (R&D Systems) в качестве показателя Т-клеточной функции. Для оценки эффекта совместного блокирования TIGIT и CD112R в отношении функции CD8 Т-клеток клетки CHO, экспрессирующие CD112 и CD155, культивировали вместе с ранее размноженными CD8 Т-клетками памяти и растворимым антителом к CD28 (Biolegend) в присутствии блокирующих антител и надосадочную жидкость собирали через 24 часа и анализировали с применением набора MSD V-plex для выявления IFN γ человека.

[00367] Для анализа антигенспецифических CTL клетки SKMEL30 предварительно обрабатывали с помощью 100 нг/мл рекомбинантного IFN γ в течение 24 часов, активировали с помощью 1 мкг/мл пептида CMVpp65₍₄₉₅₋₅₀₃₎ и культивировали вместе с ранее размноженными CD8⁺ Т-клетками, реактивными в отношении CMVpp65₍₄₉₅₋₅₀₃₎, в течение 72 часов в присутствии одиночных, двойных или тройных комбинаций антител к TIGIT, к CD112R и к PD-1 в соотношении 1:1:1 в полной среде RPMI (RPMI 1640, дополненная с помощью Glutamax (GIBCO), 10% FBS (GIBCO), Pen/strep, NEAA, пирувата натрия, β -ME и HEPES (GIBCO)). Надосадочную жидкость культуры клеток собирали через 72 часа и оценивали в отношении IFN γ с применением набора для выявления цитокинов CBA (BD bioscience) в качестве показателя активации CD8 Т-клеток.

[00368] Анализ диссоциированных опухолевых клеток человека

[00369] Опухолевые ткани, полученные посредством хирургической резекции опухоли, были предоставлены CPMC (Калифорнийский тихоокеанский медицинский центр) и группой МТ (Ван Найс, Калифорния) с согласия пациента. Ткани сначала обрабатывали посредством разрезания на мелкие кусочки с последующим ферментативным расщеплением и механической диссоциацией с помощью GentleMacs в буфере для расщепления (DMEM/F12, дополненная 10% FBS, Penn/strep, L-глутамином, HEPES, 1,5 мг/мл коллагеназы типа II, 10 мкг/мл гиалуронидазы типа iv, 10 мкМ Y-27632 и ДНКазой I) при 37°C. После расщепления суспензию клеток фильтровали через сетчатый фильтр с диаметром пор 70 мкм, обрабатывали буфером для лизиса RBC и ресуспендировали в культуральной среде.

[00370] Анализ стимуляции TIL проводили посредством культивирования 250000 диссоциированных опухолевых клеток на лунку в 96-луночной планшете в присутствии комбинаций антител к CD112R, к TIGIT, к PD-1 и/или антител изотипического контроля, каждое при 10 мкг/мл для 30 мкг/мл общего количества антител на образец в полной среде

RPMI при 37°C. Надосадочную жидкость собирали в день 3 и день 6 и анализировали в отношении IFN γ посредством MSD.

ПРИМЕР 11

[00371] В данном примере демонстрируются составы, содержащие mAb к CD112R и mAb к TIGIT.

[00372] Составы, содержащие mAb к TIGIT, mAb к CD112R или их оба (общая концентрация антител 140 мг/мл), получали и характеризовали в отношении вязкости и стабильности. Используемые в этих исследованиях mAb к TIGIT включали 43B7 и 66H9, а используемые mAb к CD112R представляли собой 1E1, 29E10 и 24F1. Результаты показаны в таблице 21.

ТАБЛИЦА 21

№ состава	mAb к TIGIT	mAb к CD112R	Вязкость (сП)
1	-	1E1	11,0
2	-	29E10	25,2
3	-	24F1	10,3
4	43B7	-	7,5
5	66H9	-	9,9
6	66H9	1E1	10,4
7	66H9	29E10	13,7
8	66H9	24F1	10,2
9	43B7	1E1	9,3
10	43B7	29E10	12,4
11	43B7	24F1	8,9

Совместные составы, содержащие смеси mAb к TIGIT и mAb к CD112R в соотношении 1:1, составляют при приблизительно 70 мг/мл каждого типа mAb. Составы на основе отдельных mAb, содержащие mAb к TIGIT или mAb к CD112R, получали при концентрации 140 мг/мл.

[00373] Как показано в таблице 21, составы, содержащие как mAb к TIGIT, так и mAb к CD112R, демонстрировали приемлемые значения вязкости, составляющие менее 15 сП. В то время как составы, содержащие либо 24F1, либо 1E1, демонстрировали приблизительно одинаковые значения вязкости (от ~9,0 до ~11,0), составы, содержащие mAb 29E10 к CD112R, демонстрировали более высокие значения вязкости.

[00374] Составы анализировали посредством эксклюзионной хроматографии (SEC) в отношении образования высокомолекулярных (HMW) разновидностей через две недели хранения при 40°C (2wk40C) по сравнению с исходным уровнем образования HMW-разновидностей (T₀, без периода хранения). Результаты показаны в таблице 22.

ТАБЛИЦА 22

№ состава	% основного пика		% HMW-разновидностей		Δ % HMW
	T ₀	2wk40C	T ₀	2wk40C	
9	98,2	96,2	1,0	1,9	0,9
11	97,9	95,6	1,3	2,5	1,2
10	98,3	96,2	1,0	2,0	1,1
6	97,7	95,9	1,3	2,7	1,4
8	97,6	95,2	1,6	3,5	1,9
7	97,7	95,5	1,4	3,0	1,6

[00375] Как показано в таблице 22, все составы демонстрировали менее чем 2% изменение в образовании HMW-разновидностей через 2 недели ускоренного хранения (40°C). Изменение % HMW-разновидностей было наименьшим для состава, содержащего 1E1 и 43B7, хотя изменение % HMW-разновидностей также составляло менее 1,5% для большинства других составов.

[00376] Эти данные подтверждают, что составы, содержащие как mAb к TIGIT, так и mAb к CD112R, являются стабильными и демонстрируют приемлемую вязкость даже при более высоких концентрациях (например, более 100 мкг/мл).

ПРИМЕР 12

[00377] В данном примере демонстрируется *in vitro* активность составов, содержащих mAb к CD112R и mAb к TIGIT.

[00378] *In vitro* активность составов, содержащих mAb к CD112R (24F1) и mAb к TIGIT (43B7.002.015) в различных соотношениях (9:1, 3:1, 1:1, 1:3 и 1:9 mAb к TIGIT:mAb к CD112R) с фиксированным количеством mAb к PD-1, оценивали *in vitro* посредством измерения количества IFN-γ, продуцируемого цитотоксическими Т-лимфоцитами при стимуляции составом. Анализ проводили при двух разных общих концентрациях mAb: 1,5 нМ (которая имитирует условия, при которых целевой охват не достиг насыщения) и 30 нМ (которая имитирует насыщение). Концентрацию mAb к PD-1 фиксировали на уровне 0,5 нМ (для составов, содержащих mAb при общей концентрации, составляющей 1,5 нМ) и 10 нМ (для составов, содержащих mAb при общей концентрации, составляющей 30 нМ). В таблице 23 обобщены количества каждого антитела в составах.

ТАБЛИЦА 23

Общая концентрация Ab (нМ)	mAb к TIGIT (нМ)	mAb к CD112R (нМ)	Антитело к PD-1 (нМ)	Соотношение mAb к TIGIT: mAb к CD112R	№ столбца
1,5	0,9	0,1	0,5	9:1	1

1,5	0,75	0,25	0,5	3:1	2
1,5	0,5	0,5	0,5	1:1	3
1,5	0,25	0,75	0,5	1:3	4
1,5	0,1	0,9	0,5	1:9	5
1,5	0,5	0,5	0	na	6
1,5	0,9	0	0,5	na	7
1,5	0	0,9	0,5	na	8
1,5	0,9	0	0	na	9
1,5	0	0,9	0	na	10
1,5	0	0	10	na	11
1,5	0	0	0	na	12
30	18	2	10	9:1	13
30	15	5	10	3:1	14
30	10	10	10	1:1	15
30	5	15	10	1:3	16
30	2	18	10	1:9	17
30	10	10	0	na	18
30	18	0	10	na	19
30	0	18	10	na	20
30	18	0	0	na	21
30	0	18	0	na	22
30	0	0	10	na	23
30	0	0	0	na	24

[00379] Как показано на фигуре 19А, все составы, содержащие mAb к TIGIT и mAb к CD112R при общем количестве Ab, составляющем 1,5 нМ (столбцы 1-6), характеризовались большей эффективностью, чем составы, не содержащие как mAb к TIGIT, так и mAb к CD112R (столбцы 7-12). Из составов, содержащих mAb к TIGIT и mAb к CD112R при общем количестве антител, составляющем 1,5 нМ (столбцы 1-6), совместный состав, характеризующийся соотношением mAb к TIGIT:mAb к CD112R, составляющим 1:1, был наиболее эффективным, поскольку было получено наиболее высокое количество IFN-гамма. При более высокой общей концентрации Ab ответы были практически одинаковыми (фигура 19В), что свидетельствует о том, что величина ответа определялась общим охватом мишени, а не соотношением двух mAb.

ПРИМЕР 13

[00380] В данном примере демонстрируется экспрессия CD112R и TIGIT на TIL человека и циркулирующих лимфоцитах.

[00381] На успех совместного состава, содержащего mAb к TIGIT и mAb к CD112R в соотношении 1:1, может влиять экспрессия этих мишеней (CD112R и TIGIT) на клетках-мишенях. Поэтому экспрессию CD112R и TIGIT оценивали посредством проточной цитометрии на TIL, тканях первичной опухоли человека *ex vivo* и соответствующих образцах крови. Было выдвинута гипотеза, что если мишени экспрессировались при значительно варьирующихся уровнях, то может быть оправдано использование соотношения, отличного от 1:1. Результаты показаны на фигурах 20A-20C. Как показано на фигуре 20A, CD8⁺ Т-клетки характеризовались тенденцией к более высоким уровням экспрессии TIGIT, чем CD112R, тогда как NK-клетки характеризовались тенденцией к повышенной экспрессии CD112R в опухолевых тканях. Кроме того, периферические CD8⁺ Т- и NK-клетки экспрессировали более сопоставимые уровни CD112R и TIGIT по сравнению с TIL (фигура 20B). Опухолевые клетки экспрессировали различные уровни лигандов CD155 и CD112 (фигура 20C). По меньшей мере некоторые из mAb к CD112R и TIGIT по настоящему изобретению демонстрируют сходный диапазон значений аффинности в отношении своих соответствующих мишеней и практически идентичные фармакокинетические профили. Поскольку экспрессия CD112R и TIGIT варьируется от донора к донору в опухоли по сравнению с кровью, как и экспрессия лигандов, насыщение мишени посредством введения доз комбинаций mAb в соотношении 1:1 является обоснованным и утонченным подходом для охвата мишеней, которые в конечном итоге сходятся на одном и том же нижележащем пути.

ПРИМЕР 14

[00382] В данном примере демонстрируется *in vivo* фармакокинетика (PK) mAb к CD112R и mAb к TIGIT у приматов, отличных от человека (NHP).

[00383] Проводили экспериментальное токсикологическое исследование для оценки токсичности и PK характеристик состава, содержащего mAb к CD112R (24F1), mAb к TIGIT (43B7.002.015) или оба антитела. Посредством медленной внутривенной (IV) болюсной инъекции группам самцов яванских макаков (3 животных на группу) вводили следующие дозы: группа 1 получала последовательное введение 0,5 мг/кг mAb к CD112R и 0,5 мг/кг mAb к TIGIT. Группа 2 получала 5 мг/кг mAb к TIGIT, а группа 3 получала 5 мг/кг mAb к CD112R. Профили зависимости средней концентрации от времени представлены на фигуре 21. Как показано на этой фигуре, после однократного IV введения воздействие повышалось примерно пропорционально дозе от 0,5 до 5 мг/кг для mAb к TIGIT и незначительно повышалось пропорционально дозе для mAb к CD112R при тех же уровнях дозы. Средние пиковые концентрации и площади под кривой зависимости концентрации от времени были одинаковыми для mAb к CD112R и mAb к TIGIT при обоих уровнях дозы, что свидетельствует о том, что PK профили являются подходящими для совместного состава в соотношении 1:1.

ПРИМЕР 15

[00384] В данном примере демонстрируется активность mAb к CD112R+mAb к TIGIT в первичных естественных клетках-киллерах (NK) человека.

[00385] Поскольку CD112R и TIGIT также регулируют NK-клеточную активность (Li et al., 2020 и Stanietzky et al., 2013), активности mAb к CD112R (24F1) и mAb к TIGIT (43B7.002.015), а также совместных составов, содержащих mAb к CD112R (24F1) и mAb к TIGIT (43B7.002.015) в соотношении 1:1, оценивали в анализе активации NK-клеток. Для этого анализа первичные NK-клетки очищали из крови здоровых доноров и затем культивировали вместе с опухолевыми клетками. Измеряли ответ NK-клеток, представленный продуцированием IFN γ и уничтожением опухолевых клеток. Очищенные NK-клетки экспрессировали высокие уровни CD226, TIGIT и CD112R, но очень низкие уровни PD-1 (фигура 22A). Опухолевые клетки-мишени эндогенно экспрессировали лиганды CD112, CD155 и PD-L1 (фигура 22B). Как показано на фигурах 22C-22D, каждое из mAb к CD112R и mAb к TIGIT по отдельности индуцировало активацию NK-клеток. Комбинация двух Ab обеспечивала дополнительное повышение уничтожения опухолевых клеток (фигура 22C) и продуцирования IFN (фигура 22D). Совместный состав, содержащий все три антитела (mAb к CD112R, mAb к TIGIT и mAb к PD-1; 3X), не приводил к дополнительному повышению уничтожения опухолевых клеток или продуцированию IFN, что согласуется с очень низким уровнем экспрессии PD-1 (фигура 22A).

[00386] Эти данные подтверждают способность составов, содержащих как mAb к TIGIT, так и mAb к CD112R, индуцировать NK-клеточную активность.

ПРИМЕР 16

[00387] В данном примере описан *ex vivo* анализ первичных лимфоцитов человека, инфильтрирующих опухоль.

[00388] Для более точного моделирования ответов инфильтрирующих опухоль Т- и NK-клеток на эндогенные опухолевые клетки разрабатывали анализ с использованием диссоциированных *ex vivo* первичных опухолевых тканей человека. Суспензию одиночных клеток из диссоциированной опухолевой ткани культивировали в присутствии mAb к TIGIT, mAb к CD112R, mAb к PD-1 или их комбинаций без каких-либо экзогенных антигенов. Идея анализа заключалась в том, что эндогенные опухолевые клетки снабжают Т- и/или NK-клетки антигенами опухолевого происхождения. Из 10 различных образцов, представляющих 4 различных показания, представляющие собой солидные опухоли (рак поджелудочной железы (PANC), колоректальный рак (CRC), трижды негативный рак молочной железы (TNBC) и рак желудка-кишечного тракта (GIST)), в 6 образцах выявляли ответ, измеренный по уровню IFN γ , в день 3. В каждом из этих случаев комбинация, содержащая все три mAb (mAb к TIGIT, mAb к CD112R и mAb к PD-1), приводила к наиболее устойчивому ответу (фигура 23), хотя максимальная кратность индукции варьировала от образца к образцу (данные не показаны).

ПРИМЕР 17

[00389] В данном примере демонстрируется *in vivo* эффективность составов,

содержащих комбинации mAb к TIGIT, mAb к CD112R и mAb к PD-1, в ксенотрансплантатных моделях.

[00390] Для этого эксперимента применяли следующие материалы и способы.

[00391] *Животные, ткани и материалы*

[00392] Использовали примерно 60-100 мышей (самок) на исследование. При первом измерении каждая мышь весила примерно 17-24 г. Линии мышей, применяемые в исследовании, включали Balb/c TIGITxCD112R с двойным КО, Balb/c CD112R-GFP KI, Balb/c TIGIT KO, Balb/c TIGITxCD112R WT/WT; C57BL/6 TIGITxCD112R с двойным КО, C57BL/6 CD112R-GFP KI, C57BL/6 TIGIT KO, C57BL/6 TIGITxCD112R WT/WT; NOD SCID IL2rg (NSG). Balb/c и C57BL/6 получали из Charles River Labs, а мышей NSG получали из Jackson Labs. Во время имплантации опухоли возраст мышей составлял от 4 до 12 недель. Мыши Balb/c были носителями опухоли CT26 (карцинома толстой кишки), C57BL/6 были носителями B16F10 (меланома), а мыши NSG были носителями опухоли CMV-SKMEL30 (меланома).

[00393] Тестируемые препараты включали совместный состав, содержащий mAb к TIGIT (43B7.002.015) и mAb к CD112R (24F1) в соотношении 1:1, клон антитела 29F.1A12 к muPD-1, антитело к PD-1 человека, и контрольные препараты включали контроль, представляющий собой среду-носитель (100% DPBS), изотипический контроль, представляющий собой mIgG1 N297G, изотипический контроль, представляющий собой hIgG1.

[00394] *Способы*

[00395] Клетки CT26, B16F10 и CMV-SKMEL30 получали из банка клеток для изучения фармакологии при раке (Amgen, Таузанд-Окс). Клетки CT26 поддерживали при 37°C в RPMI-1640, дополненной 10% □□FBS, 1% NaPyт, 1% HEPES и 1% NEAA. Клетки B16F10 поддерживали при 37°C в среде DMEM, дополненной 10% □□FBS. Клетки CMV-SKMEL30 поддерживали при 37°C в среде RPMI-1640, дополненной 10% □□FBS, 1% NaPyт, 1% NEAA, 1% GlutaMAX, 5 мкг/мл бластицина и 1 мкг/мл пуромицина. Было определено, что клетки не контаминированы микоплазмой, а также клетки были проверены с применением панели мышинных патогенов во флаконах в дополнение к подтверждению их происхождения. Собирали колбы с культурой ткани из клеток T225 и определяли количество жизнеспособных клеток посредством вытеснения трипанового синего на Vi-Cell XR (Beckman Coulter, Бреа, Калифорния). Самкам мышей путем подкожной инъекции вводили 3×10^5 клеток CT26 или B16F10 в 0,1 мл бессывороточной среды или 1×10^6 клеток CMV-SKMEL30 в 0,1 мл при 1:1 RPMI:Matrigel (BD Biosciences, Бедфорд, Массачусетс) в правый бок. В модели CMV-SKMEL30 мышам также путем внутривенной инъекции вводили $2,5 \times 10^6$ CMV-размноженных клеток CTL. Животных рандомизировали на группы таким образом, чтобы каждая группа характеризовалась одинаковыми средними объемами опухоли, составляющими примерно 100 мм³.

[00396] В сингенных моделях CT26 и B16F10 животным вводили изотипический контроль или антитело к PD-1 мыши при 100 мкг/мышь. В ксенотрансплантатной модели

CMV-SK-MEL животным вводили антитела изотипического контроля, совместный состав на основе mAb к TIGIT/mAb к CD112R (при 200 мкг/мышь) и/или антитела к PD-1 (при 300 мкг/мышь) интраперитонеально (IP) два раза в неделю (2QW). Животных взвешивали и дважды в неделю измеряли объемы опухолей. Измерения опухоли осуществляли на основании длины, ширины и высоты опухолей, измеренных с помощью электронного цифрового штангенциркуля PRO-MAX (Japan Micrometer Mfg. Co. LTD). Объем опухоли рассчитывали как $[L \times W \times H]$ и выражали в мм³.

[00397] *Статистический анализ*

[00398] Данные выражали в виде среднего объема опухоли $\pm$ стандартная ошибка среднего значения (SEM) для каждой группы, нанесенных на график в зависимости от времени. Статистический анализ для оценки эффекта обработки в отношении размера опухоли с течением времени относительно контроля проводили с применением линейной модели смешанных эффектов, реализованной в специальном приложении IVEA (v1.2.1.019). Фиксированные эффекты включали термины группы, времени с группой*время взаимодействия. Ковариационную структуру индуцировали за счет случайного эффекта субъекта. Для множественности применяли поправку Даннетта.

[00399] Выраженные данные анализировали с использованием t-критерия/ANOVA, реализованного в специально разработанном приложении IVEA (v1.2.1.019). Обычный t-критерий/ANOVA используется, когда предположения об однородности и нормальности выполняются с поправкой Уэлча в случае отсутствия однородности. Непараметрическая опция используется в случае ненормальности. Критерий Даннета/Тьюки при ANOVA для множественности или эквивалентная поправка применяется для контроля ошибки типа I.

[00400] Процентную долю подавления роста опухоли (TGI) рассчитывали как разницу между средним изменением объема опухоли в тестируемой группе и контрольной группе с использованием формулы:

[00401] $\%TGI = 100 - [(обработанный\ конечный\ объем - обработанный\ начальный\ объем) / (контрольный\ конечный\ объем - контрольный\ исходный\ объем)] \times 100$

[00402] *Результаты*

[00403] В этом исследовании эффекты тройной блокады CD112R+TIGIT+PD-1 in vivo оценивали в нескольких мышинных моделях. В первой модели получали линии мышей с нокаутом, лишенные CD112R или TIGIT или их обоих и оценивали эффекты дефицита мишени вместе блокирующим mAb к PD-1 или без него в сингенных моделях опухолей. Во второй модели получали ксенотрансплантатную модель, в которой иммунодефицитным мышам NSG имплантировали линию клеток опухоли меланомы человека (SKMEL30), которую конструировали для экспрессии антигена CMV, вместе с CD8 Т-клетками, специфическими в отношении Ag CMV. После установления опухолей мышам вводили комбинацию mAb к PD-1 человека, mAb к CD112R и TIGIT или тройную комбинацию mAb к PD-1+TIGIT+CD112R. Рост опухоли измеряли в ходе курса исследования и процентную долю подавления роста опухоли (TGI) в конце исследования рассчитывали для сравнения активности одиночной блокады PD-1, комбинации

TIGIT+CD112R (двойной нокаут или комбинированная блокада mAb) или тройной комбинации TIGIT+CD112R+PD-1 (комбинация двойного КО TIGIT+CD112R или mAb плюс mAb к PD-1) по сравнению с группой, обработанной изотипическим контролем.

[00404] Результаты исследования, показанные в виде объема опухоли, нанесенного на график в зависимости от времени (после имплантации опухоли), представлены на фигурах 24А-24С. Как показано на фигуре 24А, мыши, которых обрабатывали антителом к PD-1, и с нокаутированными генами TIGIT и CD112R, за счет чего обеспечивалась тройная блокада всех трех мишеней, характеризовались наиболее высокой степенью ингибирования роста опухоли (TGI). Блокада TIGIT (посредством КО гена) и блокада PD-1 посредством обработки антителами обеспечивала 60% TGI. Сходные результаты наблюдали у мышей B16F10 с двойным нокаутом по TIGIT/CD112R, обработанных антителом к PD-1. Тройная блокада приводила к наиболее высокой степени TGI. Как показано на фигуре 24С, тройная блокада комбинированным составом на основе mAb к TIGIT/mAb к CD112R плюс mAb к PD-1 (фиолетовый цвет) приводила к наибольшему увеличению объема опухоли относительно объема опухоли у мышей, обработанных изотипическим контролем (черный цвет). Эти результаты подтверждают, что тройная блокада CD112R+TIGIT+PD-1 подавляет рост опухоли лучше, чем двойная комбинация или одиночная блокада. Данные на фигурах 24А-24С подтверждают, что тройная блокада приводила к наиболее стабильному подавлению роста опухоли по сравнению с группами, обработанными только mAb к PD-1 или комбинацией TIGIT+CD112R. Эти результаты подтверждают, что тройная блокада TIGIT+CD112R+PD-1 является эффективной для подавления роста опухоли *in vivo*.

[00405] Эти данные свидетельствуют в пользу обработки опухолей, представленной подавлением роста опухоли *in vivo*, с блокадой TIGIT, CD112R и PD-1.

ПРИМЕР 18

[00406] В данном примере демонстрируется стабильность составов на основе mAb к TIGIT/mAb к CD112R.

[00407] mAb к CD112R (24F1) составляли с mAb к TIGIT или без него (либо 43В7.002.015 (TIGIT-10), либо 66Н9.009 (TIGIT-12)) в 9% (вес/объем) сахарозе и 10 мМ ацетате. Каждый состав дополнительно содержал конечную концентрацию 0,01% (вес/объем) полисорбата 80 (PS80). Общая концентрация антител в каждом составе составляла 140 мг/мл. Составы, содержащие как mAb к CD112R, так и mAb к TIGIT, содержали по ~70 мг/мл каждого антитела в соотношении 1:1. Затем составы хранили при -30°C, 4°C, 25°C или 40°C до 4 недель. Для оценки стабильности каждого состава образцы каждого состава затем анализировали посредством эксклюзионной сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-UHPLC) и капиллярного электрофореза в восстановительных условиях с додецилсульфатом натрия (rCE-SDS). Стабильность определяли посредством расчета процентной доли каждого отдельного компонента по сравнению с общей интегрированной площадью. Вязкость каждого состава (при сдвиге 1000 с⁻¹ при 25°C) дополнительно оценивали с применением реометра с

системой конус-плоскость.

[00408] Результаты SE-UHPLC представлены на фигурах 25А-25Н и в таблицах 24-27. В таблицах 24-27 представлены % НМВ-разновидностей и % основного пика антител хранения при -30°C, 4°C, 25°C и 40°C соответственно, и данные показаны на фигурах 25А-Д (% НМВ при хранении при -30°C, 4°C, 25°C и 40°C соответственно) и фигурах 25Е-25Н (% основного пика при хранении при -30°C, 4°C, 25°C и 40°C соответственно). Как показано на этих фигурах и в таблицах, образовывалось менее 2% НМВ-разновидностей и сохранялся основной пик, составляющий более 96,5%, даже после хранения при 40°C до 4 недель, что свидетельствует о высокой стабильности составов на основе антител.

ТАБЛИЦА 24

Температура хранения=-30°С								
Состав на основе Ab	% НМВ				% основного пика			
	Т=0	Т=1 нед.	Т=2 нед.	Т=4 нед.	Т=0	Т=1 нед.	Т=2 нед.	Т=4 нед.
CD112R	0,180			0,186	99,4			99,8
TIGIT-10	0,180			0,187	99,8			99,8
TIGIT-12	0,394			0,403	99,6			99,6
CD112R+T IGIT-10	0,250			0,233	99,8			99,8
CD112R+T IGIT-12	0,360			0,357	99,6			99,6

ТАБЛИЦА 25

Температура хранения=4°C								
Состав на основе Ab	% HMW				% основного пика			
	T=0	T=1 нед.	T=2 нед.	T=4 нед.	T=0	T=1 нед.	T=2 нед.	T=4 нед.
CD112R	0,180	0,174		0,168	99,4	99,4		99,8
TIGIT-10	0,180	0,164		0,154	99,8	99,8		99,8
TIGIT-12	0,394	0,390		0,382	99,6	99,6		99,6
CD112R+ TIGIT-10	0,250	0,256		0,262	99,8	99,7		99,7
CD112R+ TIGIT-12	0,360	0,368		0,377	99,6	99,6		99,6

ТАБЛИЦА 26

Температура хранения=25°C	
---------------------------	--

Состав на основе Ab	% HMW				% основного пика			
	T=0	T=1 нед.	T=2 нед.	T=4 нед.	T=0	T=1 нед.	T=2 нед.	T=4 нед.
CD112R	0,180	0,171	0,180	0,198	99,4	99,3	99,3	99,1
TIGIT-10	0,180	0,151	0,158	0,175	99,8	99,4	99,4	99,3
TIGIT-12	0,394	0,388	0,434	0,467	99,6	99,6	98,4	98,2
CD112R+ TIGIT-10	0,250	0,298	0,326	0,381	99,8	99,7	99,2	99,0
CD112R+ TIGIT-12	0,360	0,431	0,477	0,587	99,6	99,6	98,8	98,6

ТАБЛИЦА 27

Температура хранения=40°C								
Состав на основе Ab	% HMW				% основного пика			
	T=0	T=1 нед.	T=2 нед.	T=4 нед.	T=0	T=1 нед.	T=2 нед.	T=4 нед.
CD112R	0,180	0,239	0,299	0,464	99,4	98,9	98,4	97,5
TIGIT-10	0,180	0,189	0,239	0,332	99,8	99,1	98,6	97,8
TIGIT-12	0,394	0,577	0,731	1,001	99,6	98,0	97,6	96,7
CD112R+ TIGIT-10	0,250	0,485	0,651	1,023	99,8	98,8	99,2	97,0
CD112R+ TIGIT-12	0,360	0,782	1,093	1,646	99,6	98,4	97,7	96,7

[00409] Результаты анализа посредством rCE-SDS представлены в таблице 28 на фигуре 26. В этом анализе белковые разновидности связывают с SDS, анионным детергентом, и электрокинетически вводят в капилляр из плавленого кремния без покрытия, заполненный гелевым буфером с SDS. Через капилляр подается электрическое напряжение, под действием которого белки, покрытые SDS, разделяются в зависимости от разницы их миграции в растворе на основе гидрофильного полимера. Белки выявляют с помощью детектора с фотодиодной матрицей (PDA) по мере их прохождения через окно для УФ-выявления. Стабильность оценивают посредством определения скорректированной по процентной доле площади пика обогащенного компонента. Способ на основе rCE-SDS позволяет разделять тяжелую цепь (HC), легкую цепь (LC), негликозилированную HC (NGHC) и другие разновидности минорных пиков и групп пиков в восстанавливающих условиях. Как показано в таблице 24, все составы были относительно стабильными, с образованием приблизительно 4% пиков LMW+HMW после хранения при -30°C, 4°C, 25°C или 40°C в течение до 4 недель. Однако составы,

содержащие mAb к TIGIT-12, ассоциированы с более высоким % старения. Без ограничения какой-либо теорией, более высокий % вызван повышенным расщеплением данного антитела.

[00410] Результаты анализа вязкости показаны на фигуре 27 и в таблице 29. Как показано на этой фигуре и в таблице, в целом вязкость состава повышалась по мере повышения общей концентрации антител. Однако все тестируемые составы демонстрировали вязкость, составляющую менее 15 сП, и, таким образом, считались приемлемыми.

ТАБЛИЦА 29

Состав на основе Ab	Общая концентрация Ab (мг/мл)	Средняя вязкость (сП)	Станд. откл.
CD112R	140	11,08	0,307
TIGIT-10	140	5,98	0,064
TIGIT-12	140	7,35	0,044
CD112R	70	2,88	0,377
TIGIT-10	70	2,30	0,041
TIGIT-12	70	2,37	0,043
Совместный состав CD112R+TIGIT-10 в соотношении 1:1	140	8,34	0,922
Совместный состав CD112R+TIGIT-12 в соотношении 1:1	140	8,22	0,312

[00411] Все ссылки, включая публикации, заявки на патенты и патенты, цитируемые в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки в той же мере, как если бы каждый документ был конкретно и отдельно указан как включенный посредством ссылки и был представлен во всей своей полноте в данном документе.

[00412] Использование терминов в единственном числе, множественном числе и подобных определений в контексте описания настоящего изобретения (особенно в контексте нижеследующей формулы изобретения) должны толковаться как охватывающие как единственное число, так и множественное число, если в данном документе не указано иное или иное явно не противоречит контексту. Термины "состоящий", "имеющий", "включающий" и "содержащий" следует понимать, как открытые термины (т. е. означающие "включающий без ограничения"), если не указано иное.

[00413] Предусматривается, что приведение диапазонов значений в данном документе служит исключительно в качестве способа сокращения индивидуального указания каждого отдельного значения, входящего в данный диапазон, и каждой конечной точки, если в данном документе не указано иное, и каждое отдельное значение и конечная точка включены в настоящее описание, как если бы они были индивидуально упомянуты в данном документе.

[00414] Все способы, описанные в данном документе, можно выполнять в любом удобном порядке, если иное не указано в данном документе, или иное явно не противоречит контексту. Применение любых видов примеров или иллюстративных формулировок (например, "такой как"), предусмотренных в данном документе, предназначено исключительно для лучшего освещения настоящего изобретения и не накладывает ограничений на объем настоящего изобретения, если не заявлено иное. Ни одна формулировка в настоящем описании не должна истолковываться как указывающая на какой-либо незаявленный элемент как существенный для практической реализации настоящего изобретения.

[00415] В данном документе описаны предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, включая наилучший способ, известный авторам настоящего изобретения, для осуществления настоящего изобретения. Вариации этих предпочтительных вариантов осуществления могут стать очевидными для специалистов в данной области после прочтения вышеуказанного описания. Авторы настоящего изобретения ожидают, что специалисты в данной области будут использовать такие вариации соответствующим образом, и авторы настоящего изобретения предполагают, что настоящее изобретение будет реализовано на практике иначе, чем конкретно описано в данном документе. Соответственно, настоящее изобретение включает все модификации и эквиваленты объекта изобретения, упомянутого в прилагаемой к данному документу формуле изобретения, в установленных применимым законом пределах. Более того, любая комбинация вышеописанных элементов во всех возможных их вариациях охватывается настоящим изобретением, если в данном документе не указано иное или иное явно не противоречит контексту.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, содержащий (a) аминокислотную последовательность определяющей комплементарности области (CDR) 1 тяжелой цепи (HC), представленную в таблице A1, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности; (b) аминокислотную последовательность CDR2 HC, представленную в таблице A1, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности; (c) аминокислотную последовательность CDR3 HC, представленную в таблице A1, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности; (d) аминокислотную последовательность CDR1 легкой цепи (LC), представленную в таблице A1, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности; (e) аминокислотную последовательность CDR2 LC, представленную в таблице A1, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности; и (f) аминокислотную последовательность CDR3 LC, представленную в таблице A1, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности.

2. Антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, по п. 1 или п. 2, содержащий шесть аминокислотных последовательностей CDR, перечисленных в одной строке таблицы A1, или содержащий шесть аминокислотных последовательностей CDR, выбранных из группы, состоящей из: (a) SEQ ID NO: 13-18; (b) SEQ ID NO: 23-28; (c) SEQ ID NO: 33-38; (d) SEQ ID NO: 43-48; (e) SEQ ID NO: 53-58; (f) SEQ ID NO: 63-68; (g) SEQ ID NO: 73-78; (h) SEQ ID NO: 83-88, (i) SEQ ID NO: 93-98, (j) SEQ ID NO: 103-108, (k) SEQ ID NO: 233-238, (l) SEQ ID NO: 1973-1978, (m) SEQ ID NO: 1983-1988, (n) SEQ ID NO: 1993-1998 и (o) SEQ ID NO: 2003-2008.

3. Антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, по любому из предыдущих пунктов, содержащий (a) аминокислотную последовательность вариативной области HC, представленную в таблице B1, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-15 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% или приблизительно 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью вариативной области HC из таблицы B1; (b) аминокислотную последовательность вариативной области LC, представленную в таблице B1, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-15 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90%

или приблизительно 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью вариабельной области LC из таблицы B1, или (с) комбинацию (а) и (b).

4. Антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, по п. 4, содержащий пару аминокислотных последовательностей вариабельной области HC и вариабельной области LC, перечисленных в одной строке таблицы B1, или содержащий пару аминокислотных последовательностей, выбранную из группы, состоящей из: (a) SEQ ID NO: 11-12; (b) SEQ ID NO: 21-22; (c) SEQ ID NO: 31-32; (d) SEQ ID NO: 41-42; (e) SEQ ID NO: 51-52; (f) SEQ ID NO: 61-62; (g) SEQ ID NO: 71-72; (h) SEQ ID NO: 81-82, (i) SEQ ID NO: 91-92, (j) SEQ ID NO: 101-102, (k) SEQ ID NO: 231-232, (l) SEQ ID NO: 1971-1972, (m) SEQ ID NO: 1981-1982, (n) SEQ ID NO: 1991-1992 и (o) SEQ ID NO: 2001-2002.

5. Антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, по любому из предыдущих пунктов, содержащий (а) аминокислотную последовательность полноразмерной (FL) HC, представленную в таблице B1, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-50 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% или приблизительно 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью FL HC из таблицы B1; (b) аминокислотную последовательность FL LC, представленную в таблице B1, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-50 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% или приблизительно 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью FL LC из таблицы B1, или (с) комбинацию (а) и (b).

6. Антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, по п. 5, содержащий пару аминокислотных последовательностей полноразмерной (FL) HC и FL LC, перечисленных в одной строке таблицы B, или содержащий пару аминокислотных последовательностей, выбранную из группы, состоящей из: (a) SEQ ID NO: 9-10; (b) SEQ ID NO: 19-20; (c) SEQ ID NO: 29-30; (d) SEQ ID NO: 39-40; (e) SEQ ID NO: 49-50; (f) SEQ ID NO: 59-60; (g) SEQ ID NO: 69-70; (h) SEQ ID NO: 79-80, (i) SEQ ID NO: 89-90, (j) SEQ ID NO: 99-100, (k) SEQ ID NO: 229-230, (l) SEQ ID NO: 1969-1970, (m) SEQ ID NO: 1979-1980, (n) SEQ ID NO: 1989-1990 и (o) SEQ ID NO: 1999-2000.

7. Антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, по любому из предыдущих пунктов, который представляет собой антитело.

8. Антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, по п. 7, содержащий:
аминокислотную последовательность определяющей комплементарность области (CDR) 1 тяжелой цепи (HC) под SEQ ID NO: 33 или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности; (b) аминокислотную последовательность CDR2 HC под SEQ ID NO: 34 или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности; (с) аминокислотную

характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% или приблизительно 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью вариабельной области LC под SEQ ID NO: 82, или (с) комбинацию (а) и (b), или

(а) аминокислотную последовательность полноразмерной (FL) HC под SEQ ID NO: 29 или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-50 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% или приблизительно 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью FL HC под SEQ ID NO: 29; (b) аминокислотную последовательность FL LC, представленную под SEQ ID NO: 30, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-50 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% или приблизительно 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью FL LC под SEQ ID NO: 30, или (с) комбинацию (а) и (b), или

(а) аминокислотную последовательность полноразмерной (FL) HC под SEQ ID NO: 59 или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-50 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% или приблизительно 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью FL HC под SEQ ID NO: 59; (b) аминокислотную последовательность FL LC, представленную под SEQ ID NO: 60, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-50 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% или приблизительно 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью FL LC под SEQ ID NO: 60, или (с) комбинацию (а) и (b), или

(а) аминокислотную последовательность полноразмерной (FL) HC под SEQ ID NO: 79 или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-50 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% или приблизительно 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью FL HC под SEQ ID NO: 79; (b) аминокислотную последовательность FL LC, представленную под SEQ ID NO: 80, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-50 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% или приблизительно 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью FL LC под SEQ ID NO: 80, или (с) комбинацию (а) и (b).

9. Антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, по любому из пп. 1-6, который представляет собой антигенсвязывающий фрагмент антитела.

10. Антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, по любому из пп. 1-6, который представляет собой белковый продукт на основе антитела, необязательно scFv.

11. Нуклеиновая кислота, кодирующая антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, по любому из предыдущих пунктов.

12. Нуклеиновая кислота, кодирующая легкую цепь, тяжелую цепь или как легкую,

так и тяжелую цепь антитела по п. 7 или п. 8.

13. Нуклеиновая кислота по п. 11 или п. 12, где нуклеотидная последовательность кодирует (а) аминокислотную последовательность вариабельной области HC, представленную в таблице B1, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-15 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% или приблизительно 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью вариабельной области HC из таблицы B1; (b) аминокислотную последовательность вариабельной области LC, представленную в таблице B1, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-15 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% или приблизительно 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью вариабельной области LC из таблицы B1, или (с) как (а), так и (b).

14. Вектор, содержащий одну или несколько нуклеиновых кислот по любому из пп. 11-13.

15. Клетка-хозяин, содержащая одну или несколько нуклеиновых кислот по любому из пп. 11-13 или один или несколько векторов по п. 14.

16. Клетка-хозяин по п. 15, где клетка-хозяин продуцирует антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, по любому из пп. 1-10.

17. Антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, содержащий (а) аминокислотную последовательность определяющей комплементарность области (CDR) 1 тяжелой цепи (HC), представленную в таблице A2, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности; (b) аминокислотную последовательность CDR2 HC, представленную в таблице A2, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности; (с) аминокислотную последовательность CDR3 HC, представленную в таблице A2, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности; (d) аминокислотную последовательность CDR1 легкой цепи (LC), представленную в таблице A2, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности; (e) аминокислотную последовательность CDR2 LC, представленную в таблице A2, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности; и (f) аминокислотную последовательность CDR3 LC, представленную в таблице A2, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности.

18. Антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, по варианту осуществления 17, содержащий:

аминокислотную последовательность CDR1 LC, содержащую **Gln27** или его консервативную аминокислотную замену, **Ser28** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию; аминокислотную последовательность CDR2 LC, содержащую **Glu1** или ее консервативную аминокислотную замену; аминокислотную последовательность CDR3 LC, содержащую **Ser91** или его консервативную аминокислотную замену, **Ser92** или его консервативную аминокислотную замену, **Ser93** или его консервативную аминокислотную замену, **Leu94** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию; аминокислотную последовательность CDR1 HC, содержащую **Val32** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr33** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию; аминокислотную последовательность CDR2 HC, содержащую **Tyr52** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr54** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr55** или его консервативную аминокислотную замену, **Ser56** или его консервативную аминокислотную замену, **Gly57** или его консервативную аминокислотную замену, **Gly58** или его консервативную аминокислотную замену, **Thr59** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr60** или его консервативную аминокислотную замену, **Pro63** или его консервативную аминокислотную замену, **Arg66** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию, и аминокислотную последовательность CDR3 HC, содержащую **Ile102** или его консервативную аминокислотную замену, **Ala104** или его консервативную аминокислотную замену, **Gly107** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr108** или его консервативную аминокислотную замену, **Phe109** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr110** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr111** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию; где номер положения указан относительно аминокислотной последовательности вариабельной области LC антигенсвязывающего белка, связывающего TIGIT;

аминокислотную последовательность CDR1 LC, содержащую **Gln27** или его консервативную аминокислотную замену, **Ser28** или его консервативную аминокислотную замену, **Val29** или его консервативную аминокислотную замену, **Ser30** или его консервативную аминокислотную замену, **Ser31** или его консервативную аминокислотную замену, **Thr32** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr33** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию; аминокислотную последовательность CDR2 LC, содержащую **Glu1** или ее консервативную аминокислотную замену, **Ile2** или его консервативную аминокислотную замену, **Ser68** или его консервативную аминокислотную замену, **Gly69** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию; аминокислотную последовательность CDR3 LC, содержащую **Tyr92** или его консервативную

аминокислотную замену, **Asp93** или его консервативную аминокислотную замену, **Val94** или его консервативную аминокислотную замену, **Ser95** или его консервативную аминокислотную замену, **Pro96** или его консервативную аминокислотную замену, **Trp97** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию; аминокислотную последовательность CDR1 HC, содержащую **Gly32** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr35** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию; аминокислотную последовательность CDR2 HC, содержащую **Tyr52** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr54** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr55** или его консервативную аминокислотную замену, **Ser56** или его консервативную аминокислотную замену, **Ser58** или его консервативную аминокислотную замену, **Thr59** или его консервативную аминокислотную замену, **Phe60** или его консервативную аминокислотную замену, **Pro63** или его консервативную аминокислотную замену, **Lys66** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию; аминокислотную последовательность CDR3 HC, содержащую **Arg102** или его консервативную аминокислотную замену, **Asn104** или его консервативную аминокислотную замену, **Trp105** или его консервативную аминокислотную замену, **Asn106** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr107** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию; где номер положения указан относительно аминокислотной последовательности вариабельной области LC антигенсвязывающего белка, связывающего TIGIT;

аминокислотную последовательность CDR1 LC, содержащую **Arg30** или его консервативную аминокислотную замену, **Arg31** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr32** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию; аминокислотную последовательность CDR3 LC, содержащую **Ser91** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr92** или его консервативную аминокислотную замену, **Ser93** или его консервативную аминокислотную замену, **Thr94** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию; где номер положения указан относительно аминокислотной последовательности вариабельной области LC антигенсвязывающего белка, связывающего TIGIT; аминокислотную последовательность CDR1 HC, содержащую **Thr30** или его консервативную аминокислотную замену, **Gly31** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr32** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr33** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию; аминокислотную последовательность CDR2 HC, содержащую **Trp47** или его консервативную аминокислотную замену, **Trp50** или его консервативную аминокислотную замену, **Ser52** или его консервативную аминокислотную замену, **Thr54** или его консервативную аминокислотную замену, **Ser55** или его консервативную аминокислотную замену, **Ala57** или его консервативную аминокислотную замену, **Thr58** или его консервативную аминокислотную замену, **Gly59** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr60**

или его консервативную аминокислотную замену, **Gln65** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию; аминокислотную последовательность CDR3 HC, содержащую **Asn101** или его консервативную аминокислотную замену, **Ser102** или его консервативную аминокислотную замену, **Val103** или его консервативную аминокислотную замену, **Leu104** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr105** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr106** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr107** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию; где номер положения указан относительно аминокислотной последовательности варибельной области HC антигенсвязывающего белка, связывающего TIGIT;

аминокислотную последовательность CDR1 LC, содержащую **Gln27** или его консервативную аминокислотную замену, **Leu30** или его консервативную аминокислотную замену, **Ser32** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию; аминокислотную последовательность CDR3 LC, содержащую **Ser96** или его консервативную аминокислотную замену, **Ile97** или его консервативную аминокислотную замену, **Gln98** или его консервативную аминокислотную замену, **Leu99** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию; аминокислотную последовательность CDR1 HC, содержащую **Asp33** или его консервативную аминокислотную замену; аминокислотную последовательность CDR2 HC, содержащую **Tyr52** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr54** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr55** или его консервативную аминокислотную замену, **Ser56** или его консервативную аминокислотную замену, **Gly57** или его консервативную аминокислотную замену, **Gly58** или его консервативную аминокислотную замену, **Thr59** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr60** или его консервативную аминокислотную замену, **Pro63** или его консервативную аминокислотную замену, **Lys66** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию; аминокислотную последовательность CDR3 HC, содержащую **Ile102** или его консервативную аминокислотную замену, **Ala104** или его консервативную аминокислотную замену, **Gly107** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr108** или его консервативную аминокислотную замену, **Phe109** или его консервативную аминокислотную замену, **Tyr110** или его консервативную аминокислотную замену, **Phe111** или его консервативную аминокислотную замену или любую их комбинацию; где номер положения указан относительно аминокислотной последовательности варибельной области HC антигенсвязывающего белка, связывающего TIGIT.

19. Антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, по п. 17 или п. 18, содержащий шесть аминокислотных последовательностей CDR, перечисленных в одной строке таблицы A2, или содержащий шесть аминокислотных последовательностей CDR, выбранных из группы, состоящей из: (a) SEQ ID NO: 113-118; (b) SEQ ID NO: 123-128; (c) SEQ ID NO: 133-138; (d) SEQ ID NO: 143-148; (e) SEQ ID NO: 153-158; (f) SEQ ID NO: 163-168; (g) SEQ ID NO: 173-178; (h) SEQ ID NO: 183-188, (i) SEQ ID NO: 193-198, (j) SEQ

ID NO: 203-208, (k) SEQ ID NO: 213-218, (l) SEQ ID NO: 223-228 и (m) SEQ ID NO: 2013-2018.

20. Антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, по любому из пп. 17-19, содержащий (a) аминокислотную последовательность вариабельной области HC, представленную в таблице B2, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-15 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% или приблизительно 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью вариабельной области HC из таблицы B2; (b) аминокислотную последовательность вариабельной области LC, представленную в таблице B2, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-15 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% или приблизительно 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью вариабельной области LC из таблицы B2, или (c) комбинацию (a) и (b).

21. Антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, по п. 20, содержащий пару аминокислотных последовательностей вариабельной области HC и вариабельной области LC, перечисленных в одной строке таблицы B2, или содержащий пару аминокислотных последовательностей, выбранную из группы, состоящей из: (a) SEQ ID NO: 111-112, (b) SEQ ID NO: 121-122, (c) SEQ ID NO: 131-132, (d) SEQ ID NO: 141-142, (e) SEQ ID NO: 151-152, (f) SEQ ID NO: 161-162, (g) SEQ ID NO: 171-172, (h) SEQ ID NO: 181-182, (i) SEQ ID NO: 191-192, (j) SEQ ID NO: 201-202, (k) SEQ ID NO: 211-212, (l) SEQ ID NO: 221-222 и (m) SEQ ID NO: 2011-2012.

22. Антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, по любому из пп. 17-21, содержащий (a) аминокислотную последовательность полноразмерной (FL) HC, представленную в таблице B2, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-50 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% или приблизительно 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью FL HC из таблицы B2; (b) аминокислотную последовательность FL LC, представленную в таблице B2, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-50 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% или приблизительно 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью FL LC из таблицы B2, или (c) комбинацию (a) и (b).

23. Антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, по п. 22, содержащий пару аминокислотных последовательностей полноразмерной (FL) HC и FL LC, перечисленных в одной строке таблицы B2, или содержащий пару аминокислотных последовательностей, выбранную из группы, состоящей из: (a) SEQ ID NO: 109-110, (b) SEQ ID NO: 119-120, (c) SEQ ID NO: 129-130, (d) SEQ ID NO: 139-140, (e) SEQ ID NO: 149-150, (f) SEQ ID NO: 159-160, (g) SEQ ID NO: 169-170, (h) SEQ ID NO: 179-180, (i) SEQ ID NO: 189-190, (j) SEQ ID NO: 199-200, (k) SEQ ID NO: 209-210, (l) SEQ ID NO: 219-220 и (m) SEQ ID NO: 2009-

2010.

24. Антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, по любому из пп. 17-23, который представляет собой антитело.

25. Антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, по п. 24, содержащий:

аминокислотную последовательность определяющей комплементарность области (CDR) 1 тяжелой цепи (HC) под SEQ ID NO: 203 или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности; (b) аминокислотную последовательность CDR2 HC под SEQ ID NO: 204 или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности; (c) аминокислотную последовательность CDR3 HC под SEQ ID NO: 205 или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности; (d) аминокислотную последовательность CDR1 легкой цепи (LC) под SEQ ID NO: 206 или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности; (e) аминокислотную последовательность CDR2 LC под SEQ ID NO: 207 или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности; (f) аминокислотную последовательность CDR3 LC под SEQ ID NO: 208 или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности, или

аминокислотную последовательность определяющей комплементарность области (CDR) 1 тяжелой цепи (HC) под SEQ ID NO: 223 или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности; (b) аминокислотную последовательность CDR2 HC под SEQ ID NO: 224 или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности; (c) аминокислотную последовательность CDR3 HC под SEQ ID NO: 225 или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности; (d) аминокислотную последовательность CDR1 легкой цепи (LC) под SEQ ID NO: 226 или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-4 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности; (e) аминокислотную последовательность CDR2 LC под SEQ ID NO: 227 или ее вариантную

последовательностью FL HC под SEQ ID NO: 219; (b) аминокислотную последовательность FL LC, представленную под SEQ ID NO: 220, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-50 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% или приблизительно 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью FL LC под SEQ ID NO: 220, или (c) комбинацию (a) и (b).

26. Антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, по любому из пп. 17-23, который представляет собой антигенсвязывающий фрагмент антитела.

27. Антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, по любому из пп. 17-23, который представляет собой белковый продукт на основе антитела, необязательно scFv.

28. Нуклеиновая кислота, кодирующая антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, по любому из предыдущих пунктов.

29. Нуклеиновая кислота, кодирующая легкую цепь, тяжелую цепь, или как легкую, так и тяжелую цепь антитела по п. 24 или п. 25.

30. Нуклеиновая кислота по п. 28 или п. 29, где нуклеотидная последовательность кодирует (a) аминокислотную последовательность вариабельной области HC, представленную в таблице B2, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-15 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% или приблизительно 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью вариабельной области HC из таблицы B2; (b) аминокислотную последовательность вариабельной области LC, представленную в таблице B2, или ее вариантную последовательность, которая отличается только 1-15 аминокислотами, или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% или приблизительно 95% идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью вариабельной области LC из таблицы B2, или (c) как (a), так и (b).

31. Вектор, содержащий одну или несколько нуклеиновых кислот по любому из пп. 28-30.

32. Клетка-хозяин, содержащая одну или несколько нуклеиновых кислот по любому из пп. 28-30 или один или несколько векторов по п. 31.

33. Клетка-хозяин по п. 31, где клетка-хозяин продуцирует антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, по любому из пп. 17-27.

34. Композиция, содержащая антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, по любому из пп. 1-10 и антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, по любому из пп. 17-27.

35. Композиция по п. 34, где (A) антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, представляет собой 1E1, 1E1.016, 24F1, 29E10, 24F1.001, 29E10_CONS.020, 29E10_CONS.021, 29E10_CONS.022, 29E10_CONS.025, 11E4, 31B3, 27G12, 28F9, 28H7 или 36C8, как описано в таблице A1 или таблице B1, необязательно 24F1, 29E10_CONS.020 или 29E10_CONS.022, (B) антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, представляет собой любой из 55G7.041.008, 58A7.003.008.075, 4G10, 11A3, 28B8,

39D2, 43B7, 55G7, 66H9, 43B7.002.015, 58A7.003.08, 66H9.009 или 58A7, как описано в таблице A2 или таблице B2, необязательно 43B7.002.015 или 66H9.009, или комбинацию (A) и (B).

36. Композиция по п. 34 или п. 35, где композиция содержит (A) 24F1 и 43B7.002.015, (B) 24F1 и 66H9.009, (C) 29E10_CONS.020 и 43B7.002.015, (D) 29E10_CONS.020 и 66H9.009, (E) 29E10_CONS.022 и 43B7.002.015, (F) 29E10_CONS.022 и 66H9.009, (G) 43B7.002.015 и 1E1.016, (H) 43B7.002.015 и 24F1, (I) 43B7.002.015 и 29E10, (J) 66H9.009 и 1E1.016, (K) 66H9.009 и 29E10, (L) 43B7 и 29E10, (M) 43B7 и 24F1 или (N) 43B7 и 11E4.

37. Композиция по любому из пп. 34-36, где антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, и антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, присутствуют в композиции в соотношении, составляющем приблизительно 1:1.

38. Композиция по любому из пп. 34-37, дополнительно содержащая антигенсвязывающий белок, связывающий PD-1.

39. Набор, содержащий антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-10 и пп. 17-27, нуклеиновую кислоту по любому из пп. 11-13 и пп. 28-30, вектор по п. 14 или п. 31, клетку-хозяина по любому из пп. 15, 16, 32 и п. 33, композицию по любому из пп. 34-38 или их комбинацию, и контейнер.

40. Набор по п. 39, дополнительно содержащий антигенсвязывающий белок, связывающий PD-1.

41. Фармацевтическая композиция, содержащая антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1-10 и пп. 17-27, нуклеиновую кислоту по любому из пп. 11-13 и пп. 28-30, вектор по п. 14 или п. 31, клетку-хозяина по любому из пп. 15, 16, 32 и п. 33, композицию по любому из пп. 33-36 или их комбинацию, и фармацевтически приемлемый носитель, вспомогательное вещество или разбавитель.

42. Фармацевтическая композиция по п. 41, дополнительно содержащая антигенсвязывающий белок, связывающий PD-1.

43. Способ получения антигенсвязывающего белка, связывающего CD112R, включающий культивирование клетки-хозяина по любому из п. 15 или п. 16 в целях обеспечения экспрессии антигенсвязывающего белка, связывающего CD112R, и сбор экспрессирующегося антигенсвязывающего белка, связывающего CD112R.

44. Способ получения антигенсвязывающего белка, связывающего TIGIT, включающий культивирование клетки-хозяина по любому из п. 32 или п. 33 в целях обеспечения экспрессии антигенсвязывающего белка, связывающего TIGIT, и сбор экспрессирующегося антигенсвязывающего белка, связывающего TIGIT.

45. Способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции по п. 41 или п. 42 в количестве, эффективном для лечения субъекта.

46. Способ по п. 45, где у субъекта имеется солидная опухоль, и фармацевтическую композицию вводят субъекту в количестве, эффективном для лечения солидной опухоли у

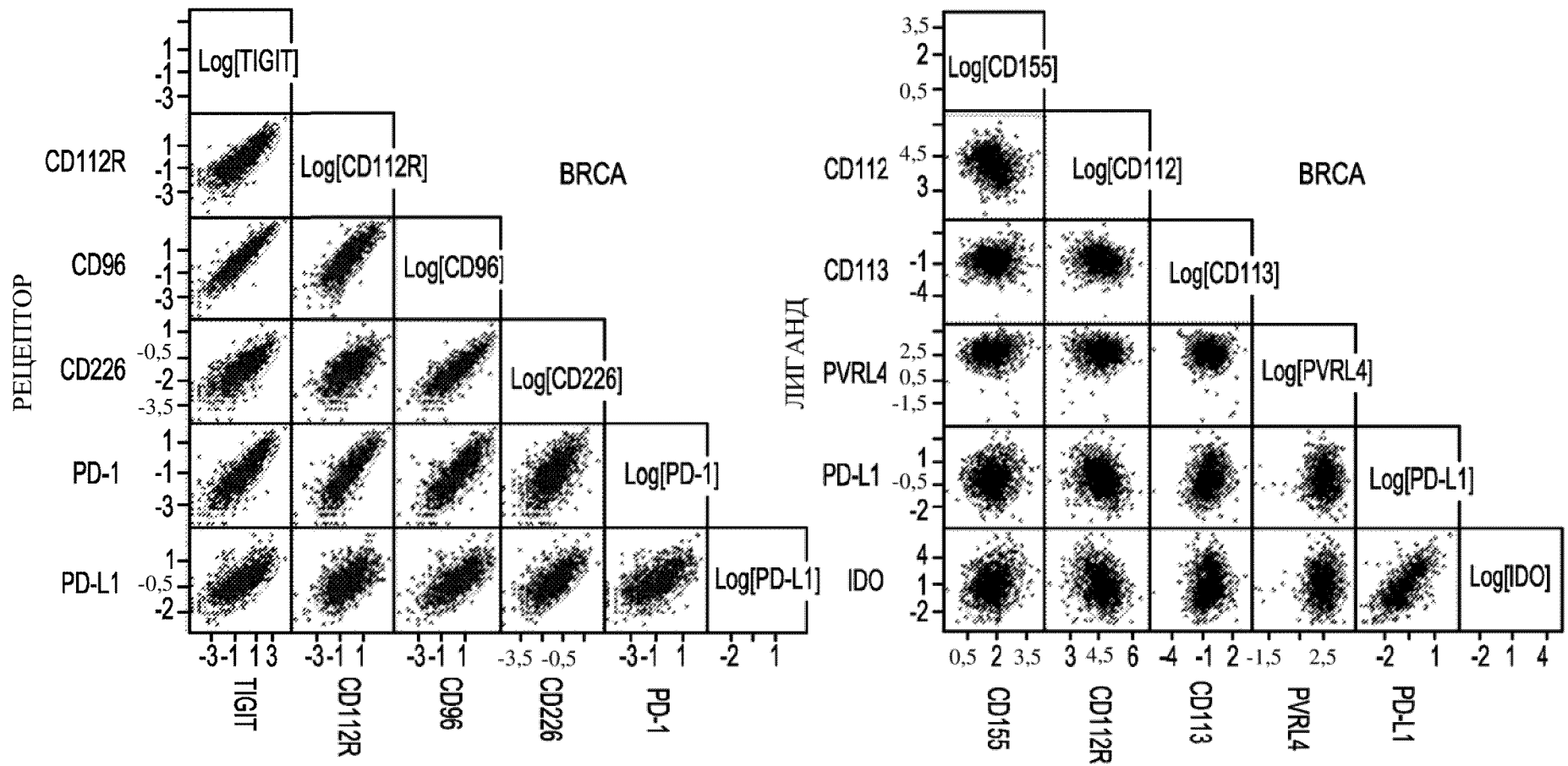
субъекта.

47. Способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, первой фармацевтической композиции, содержащей антигенсвязывающий белок, связывающий CD112R, и антигенсвязывающий белок, связывающий TIGIT, и второй фармацевтической композиции, содержащей ингибитор PD-1.

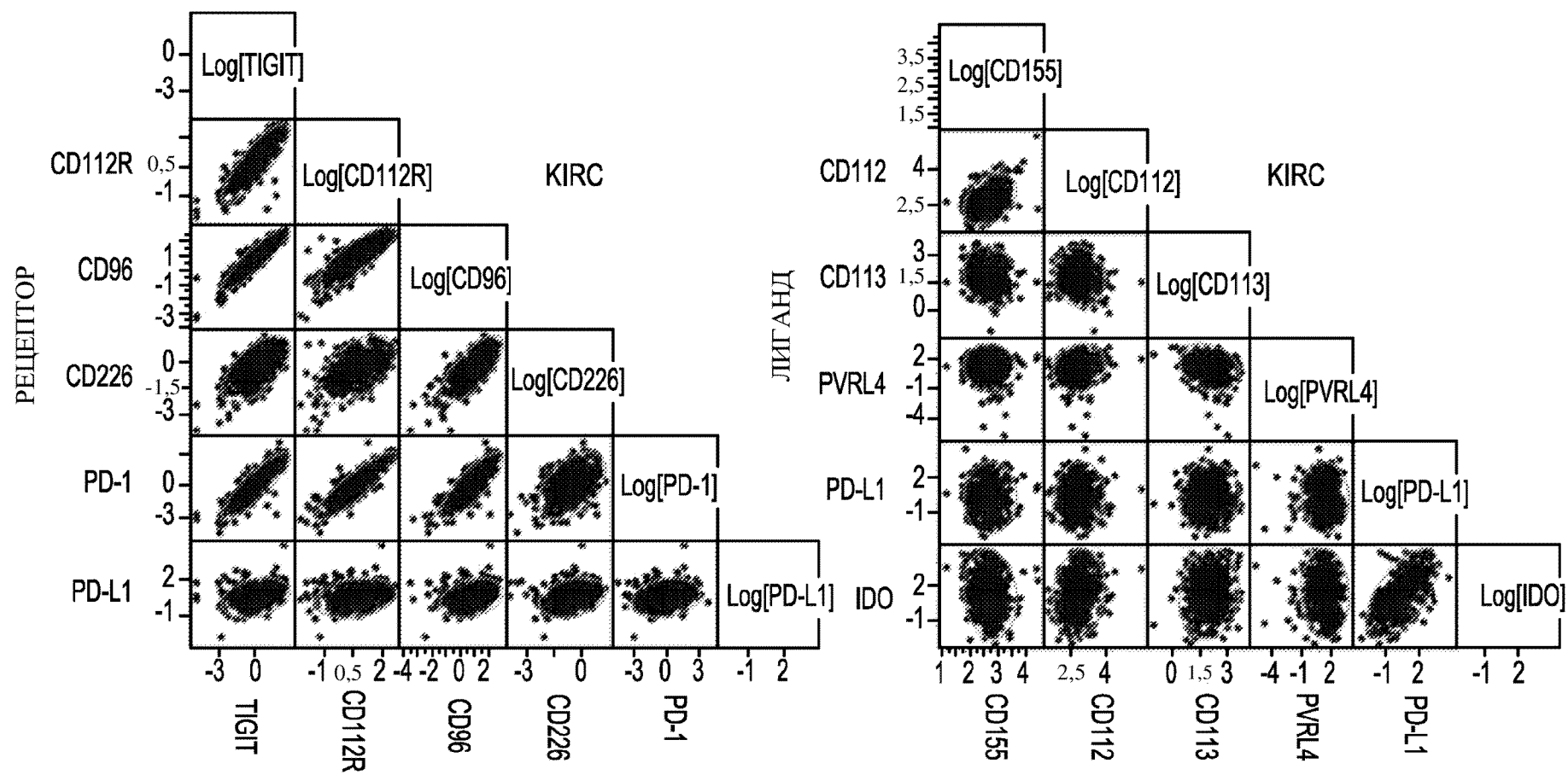
48. Способ по п. 47, где у субъекта имеется солидная опухоль, и первую фармацевтическую композицию и вторую фармацевтическую композицию вводят субъекту в количествах, эффективных для лечения солидной опухоли у субъекта.

По доверенности

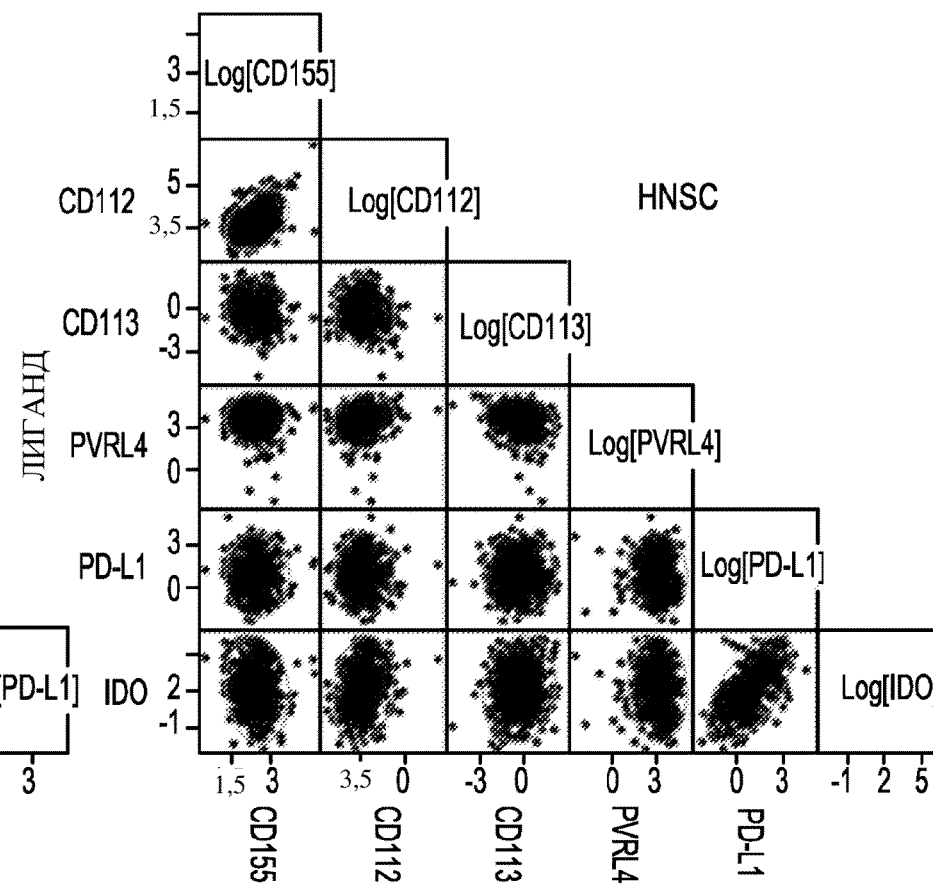
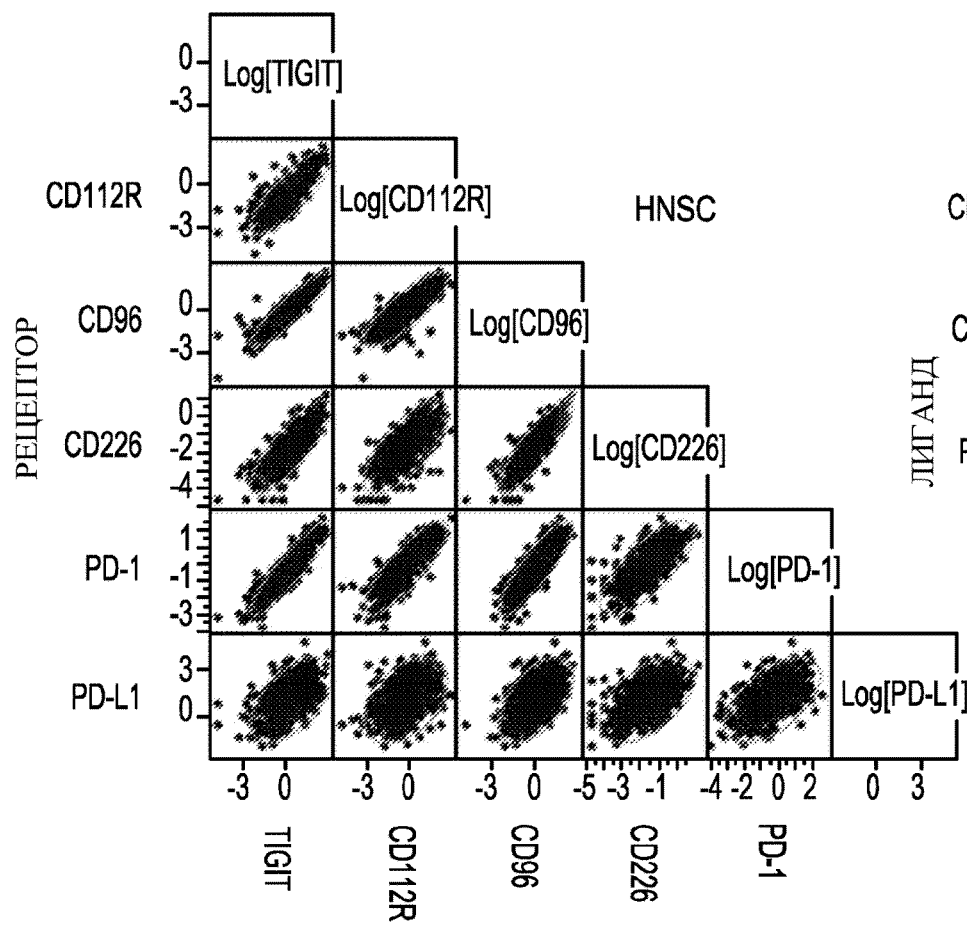
Фиг. 1А-1



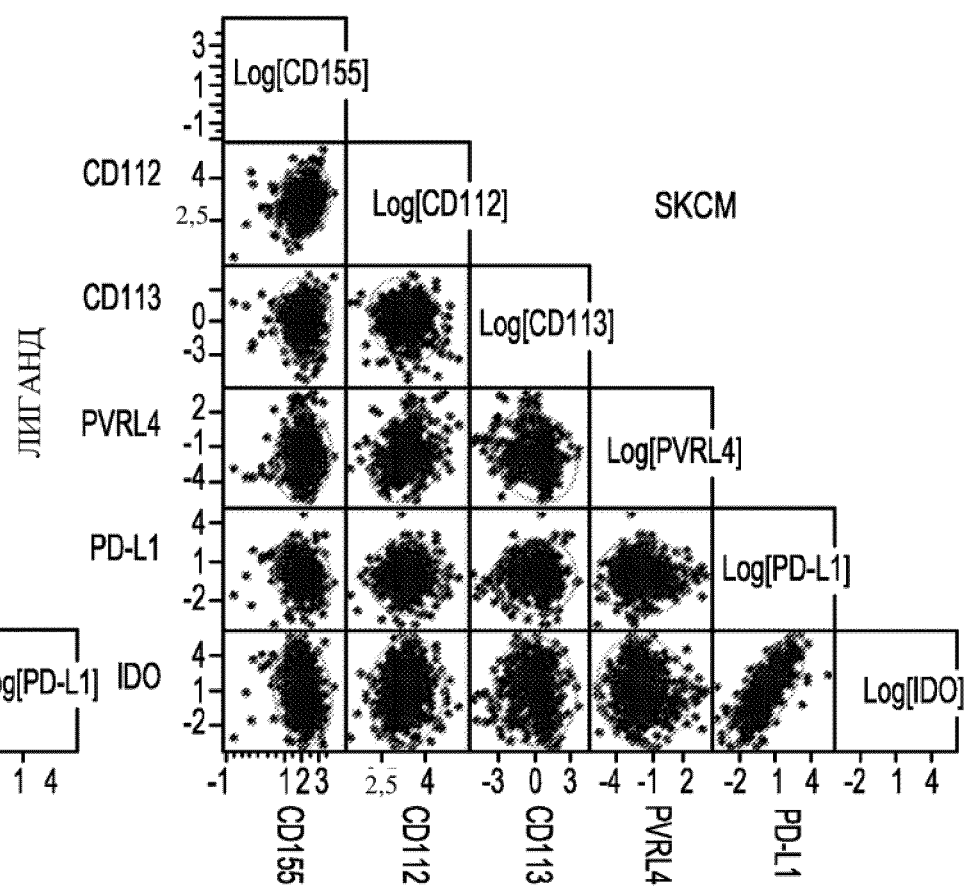
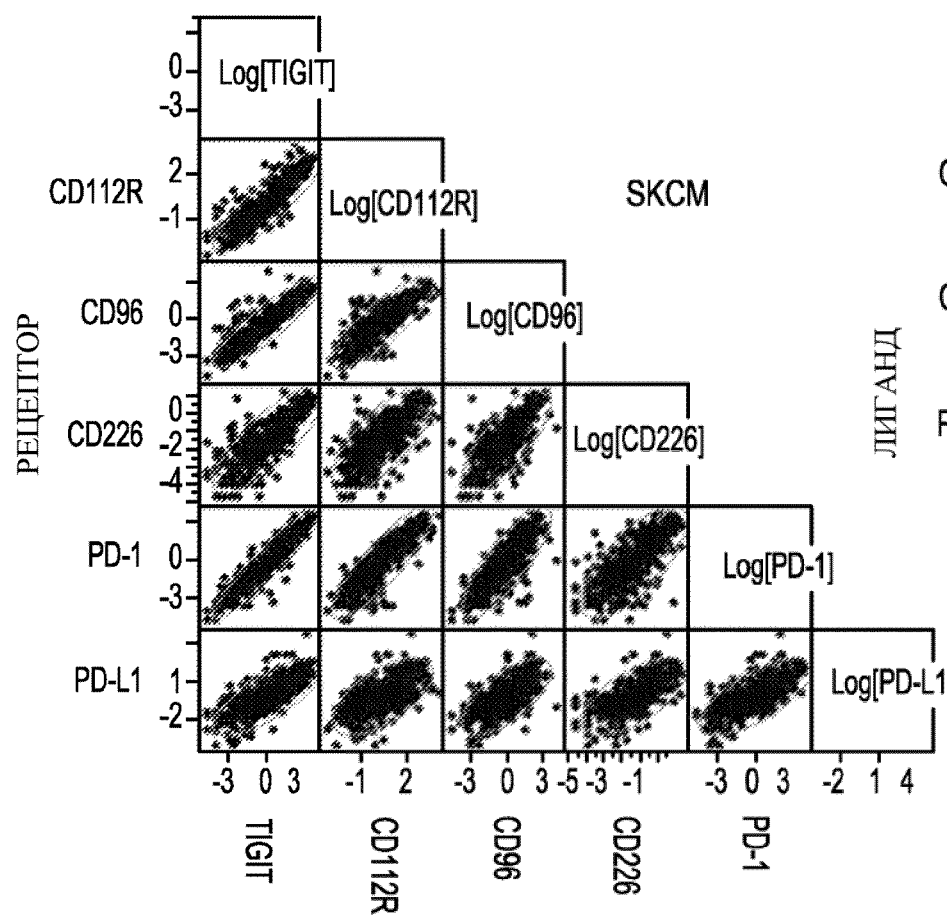
Фиг. 1А-2



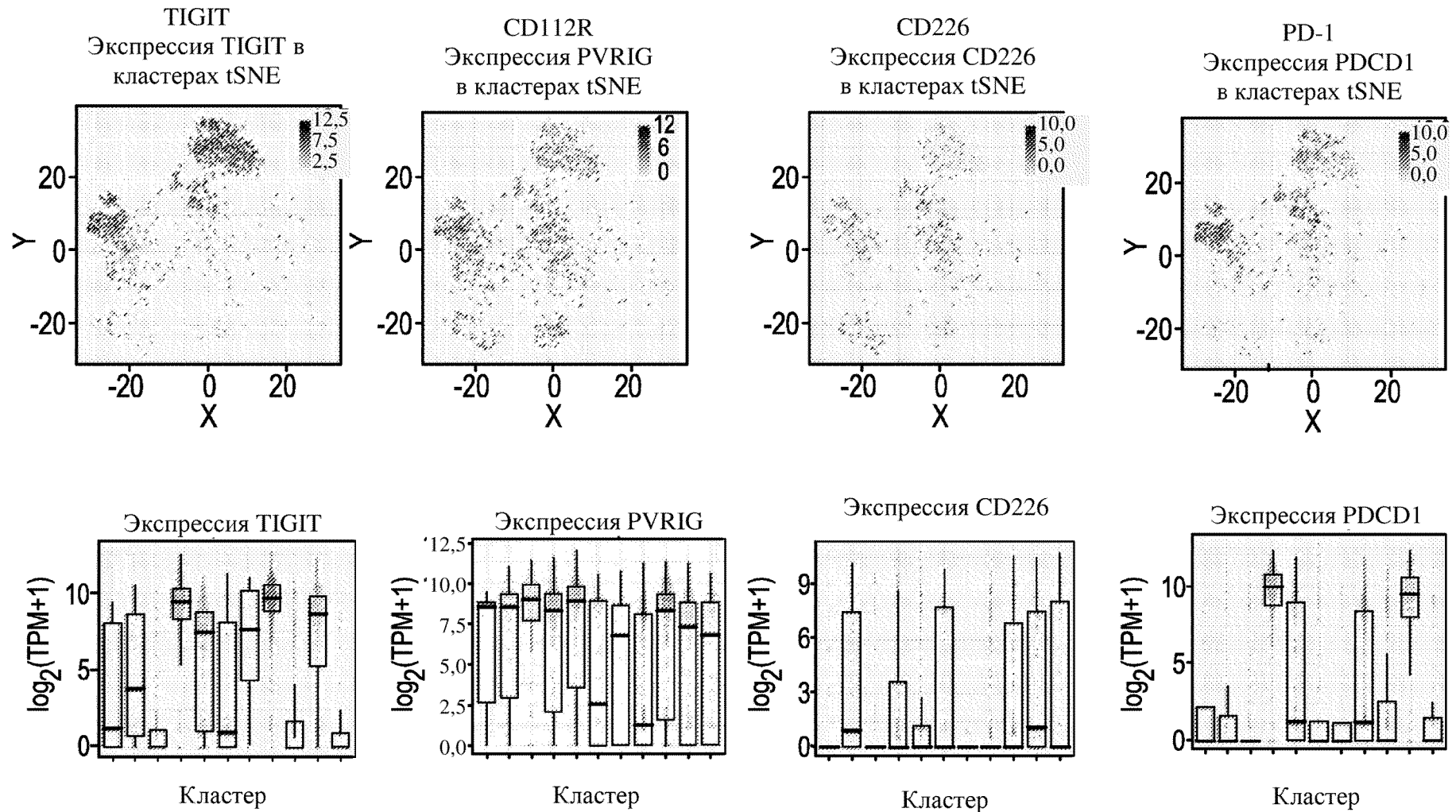
Фиг. 1А-3



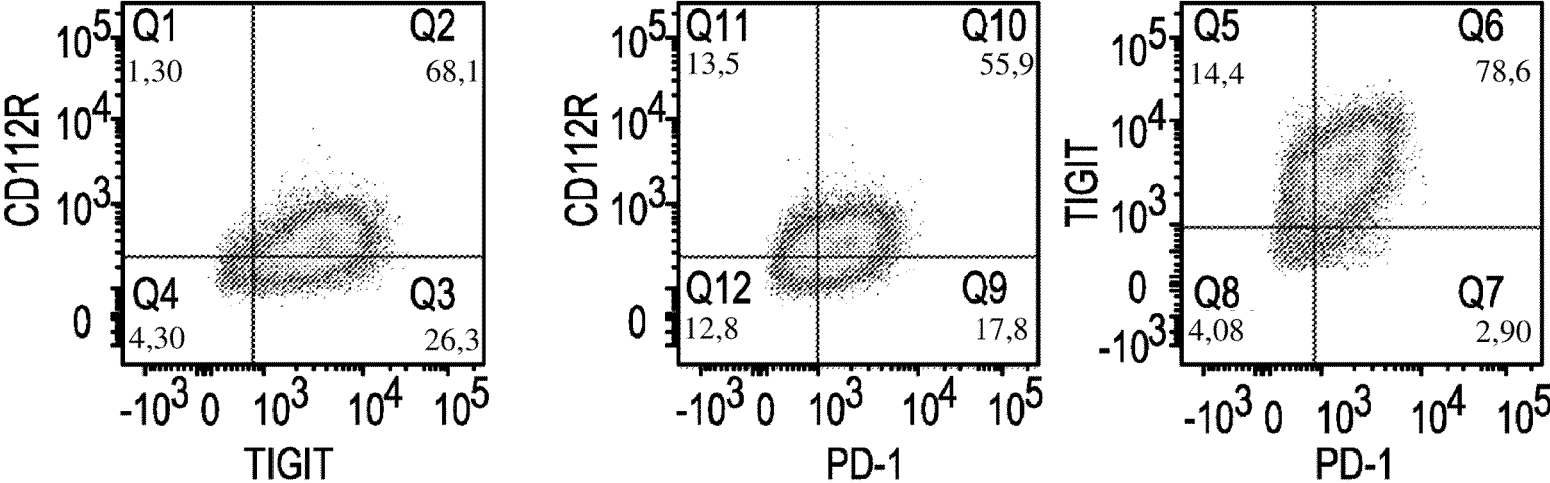
Фиг. 1А-4



Фиг. 1В



Фиг. 1С

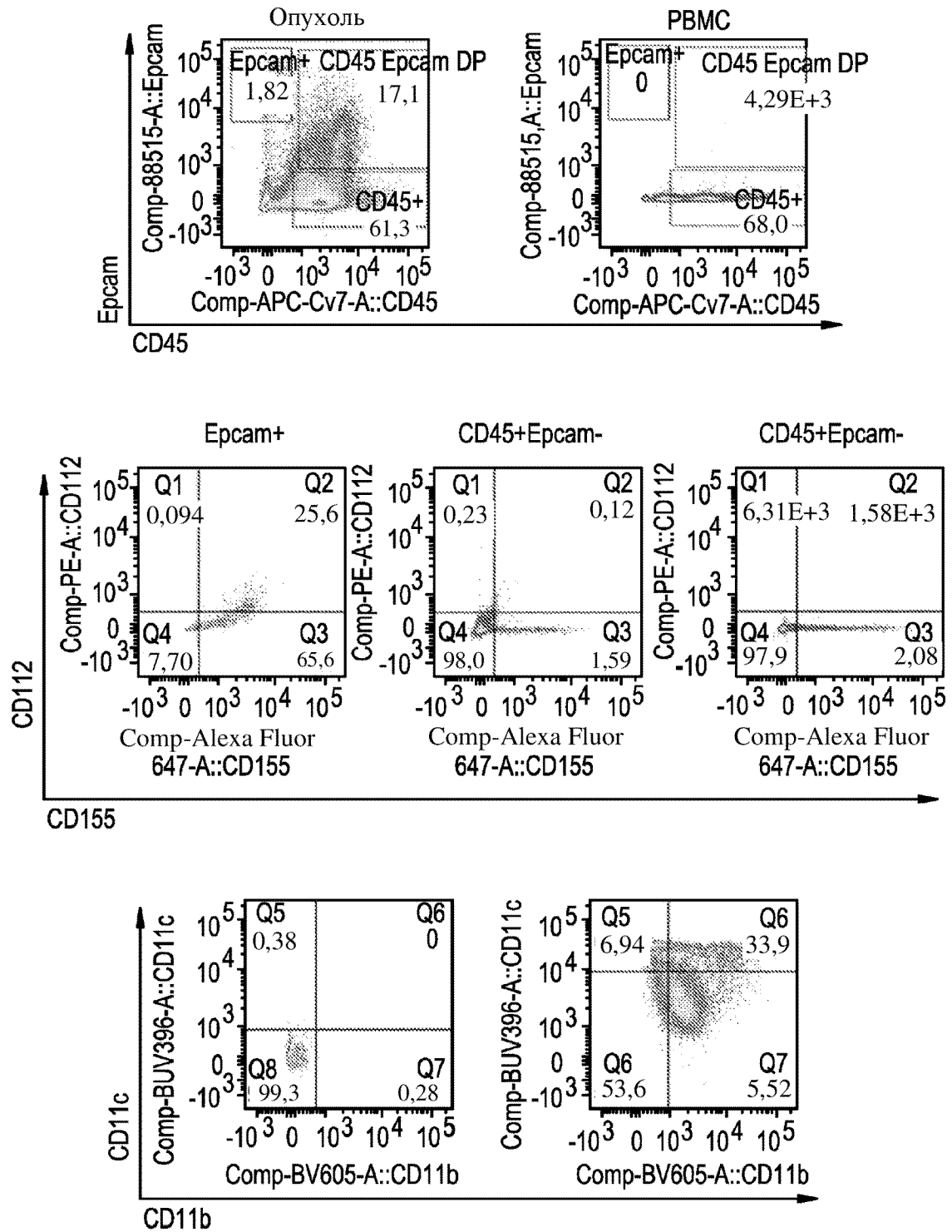


6/74

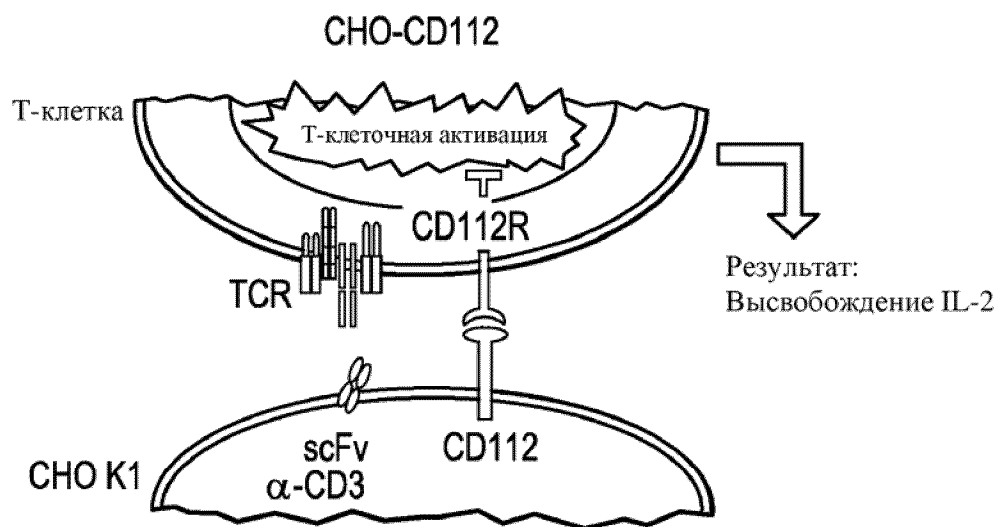
Фиг. 1D

	CD112R+(%)			TIGIT+(%)			PD-1+(%)		
CD4T	2,5	1,6	3,2	22,2	0,13	47,9	24	0,65	15,8
CD8T	1,78	1,17	0	1,19	0,63	33	2,9	0,81	8,9
NK	7,31	2,85	3,91	10,8	0,1	16,8	41,2	2,47	21

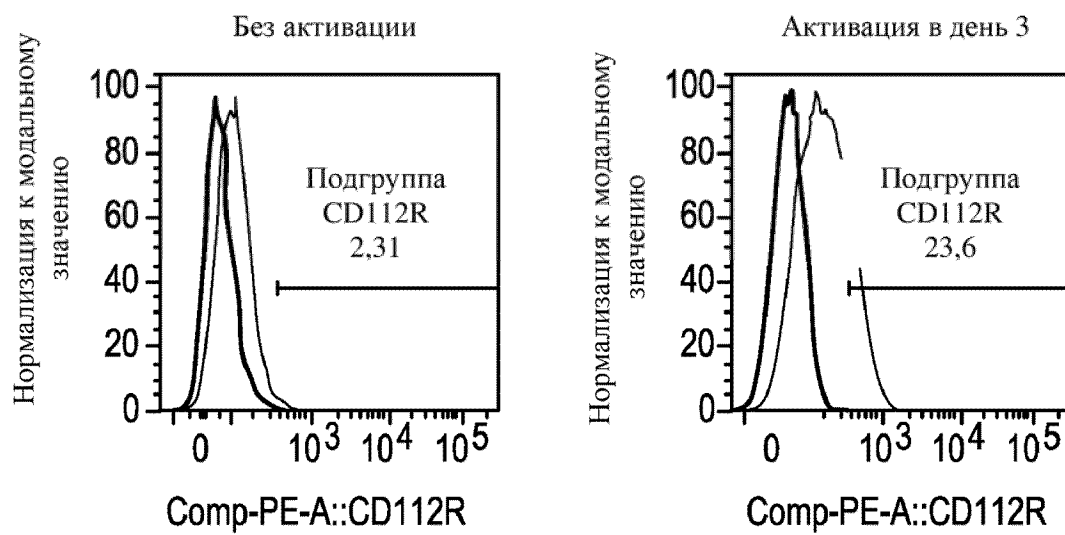
Фиг. 1Е



Фиг. 2А



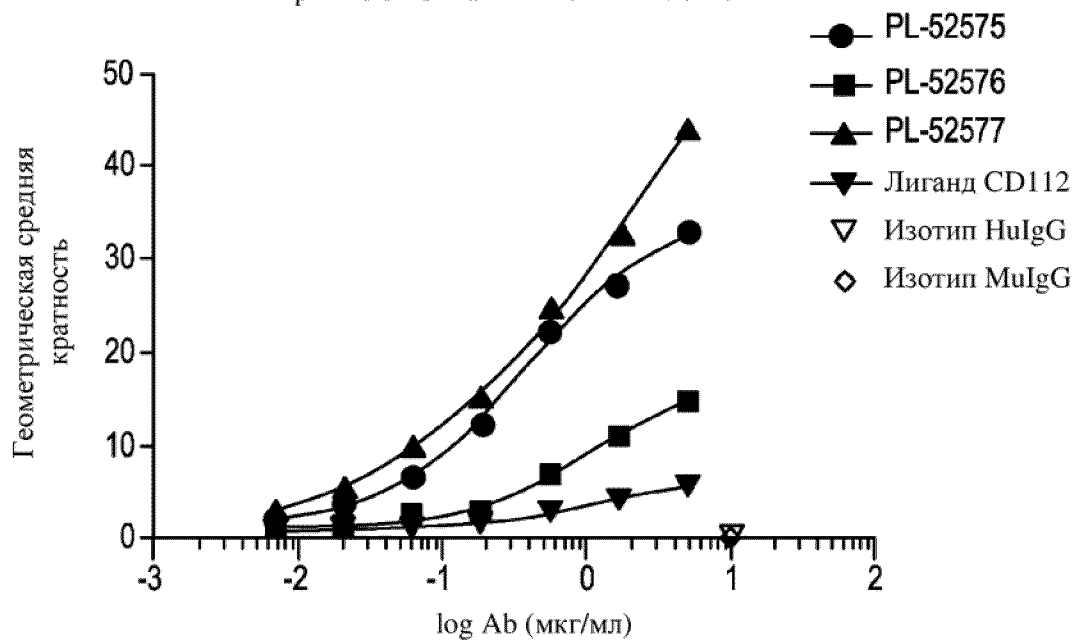
Фиг. 2В



9/74

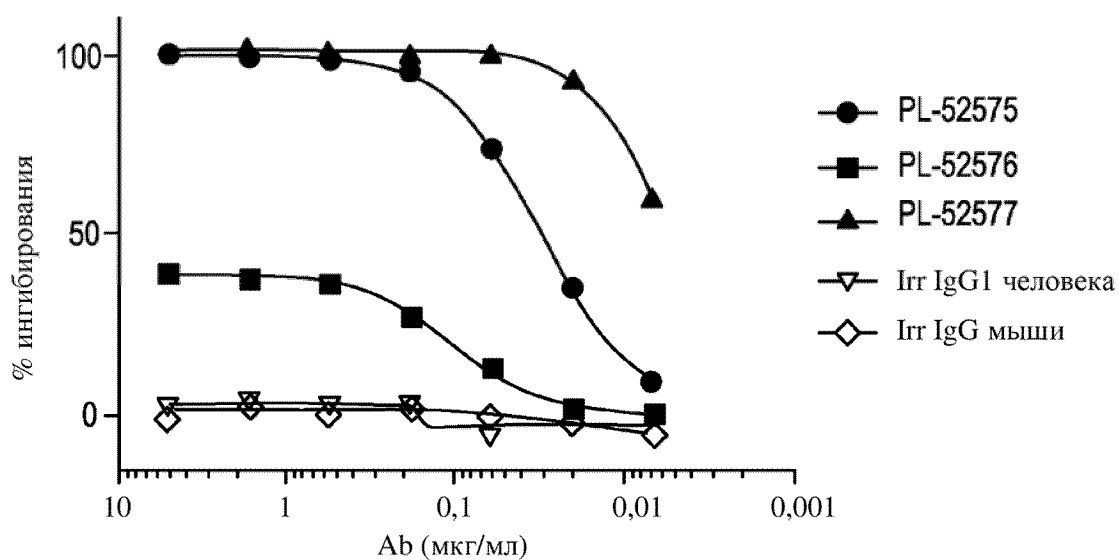
Фиг. 2С

Кривые связывания huCD112R/CHO



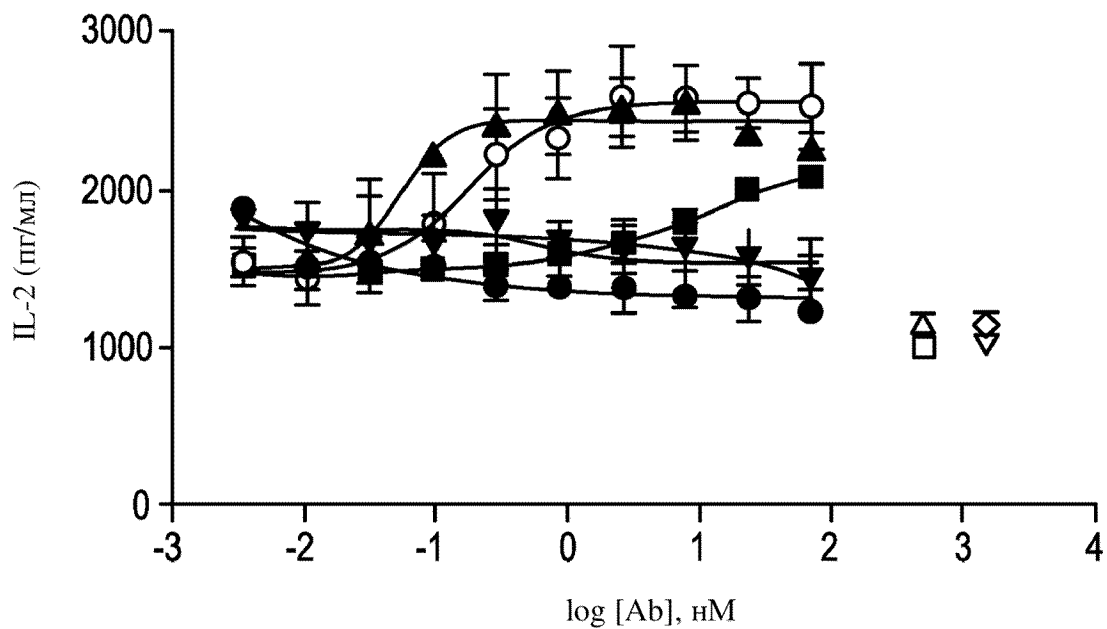
Фиг. 2D

Кривые ингибирования R/L



10/74

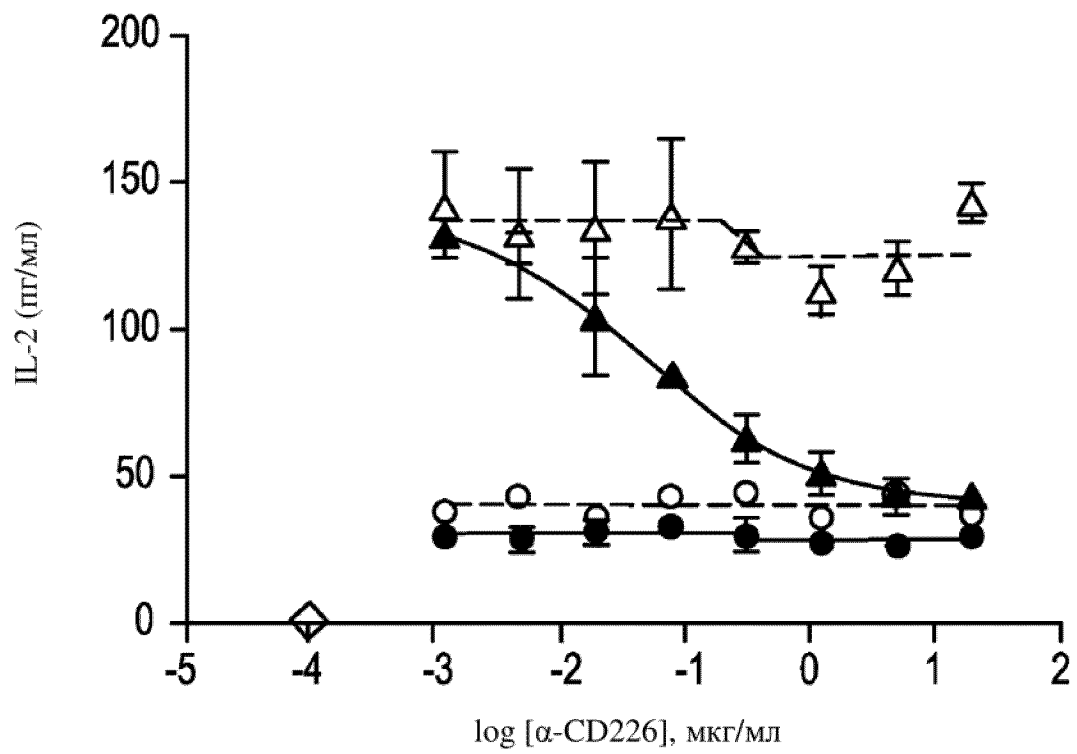
Фиг. 2Е



	PL-52575	PL-52576	PL-52577
EC50 (нМ)	0,1822	12,73	0,05351



Фиг. 2F



◇ Только Т-клетки

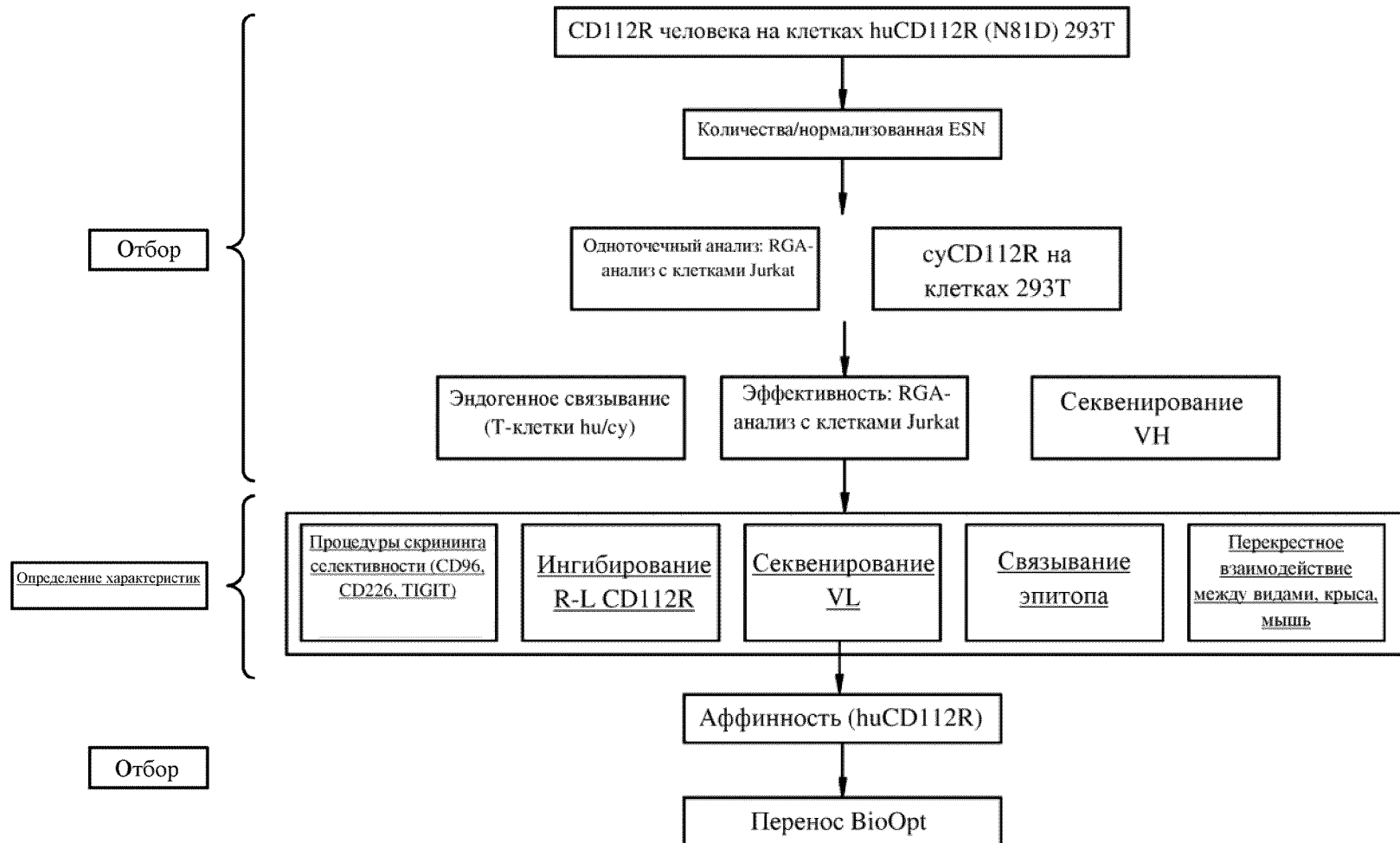
—○— Вектор-CHO + изотип

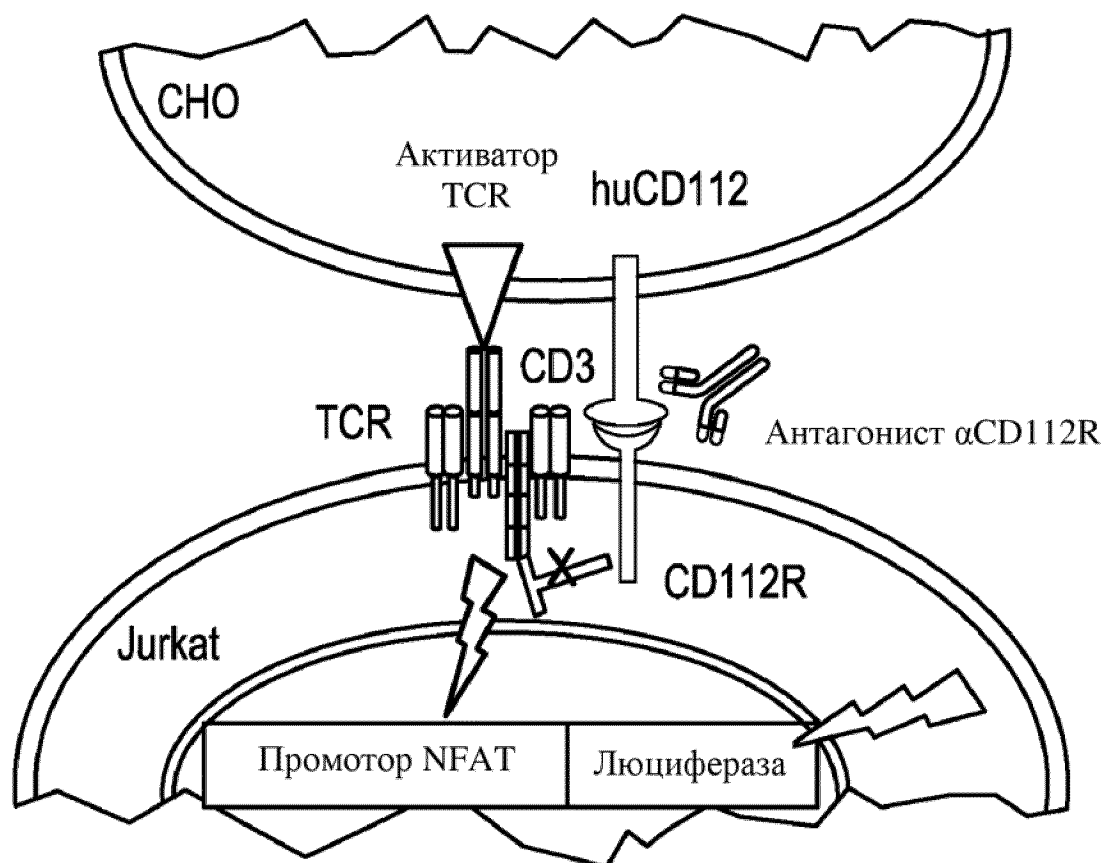
—●— Вектор-CHO + $\alpha\text{-CD226}$

—△— CD112-CHO + изотип

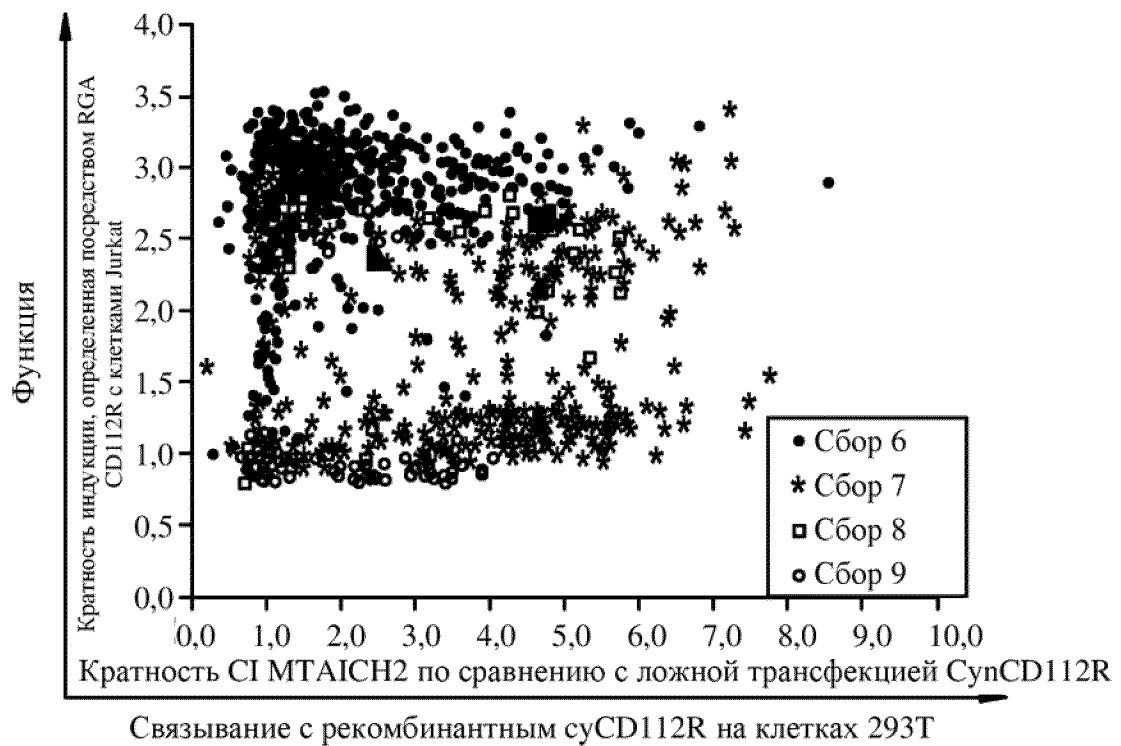
—▲— CD112-CHO + $\alpha\text{-CD226}$

Фиг. 3

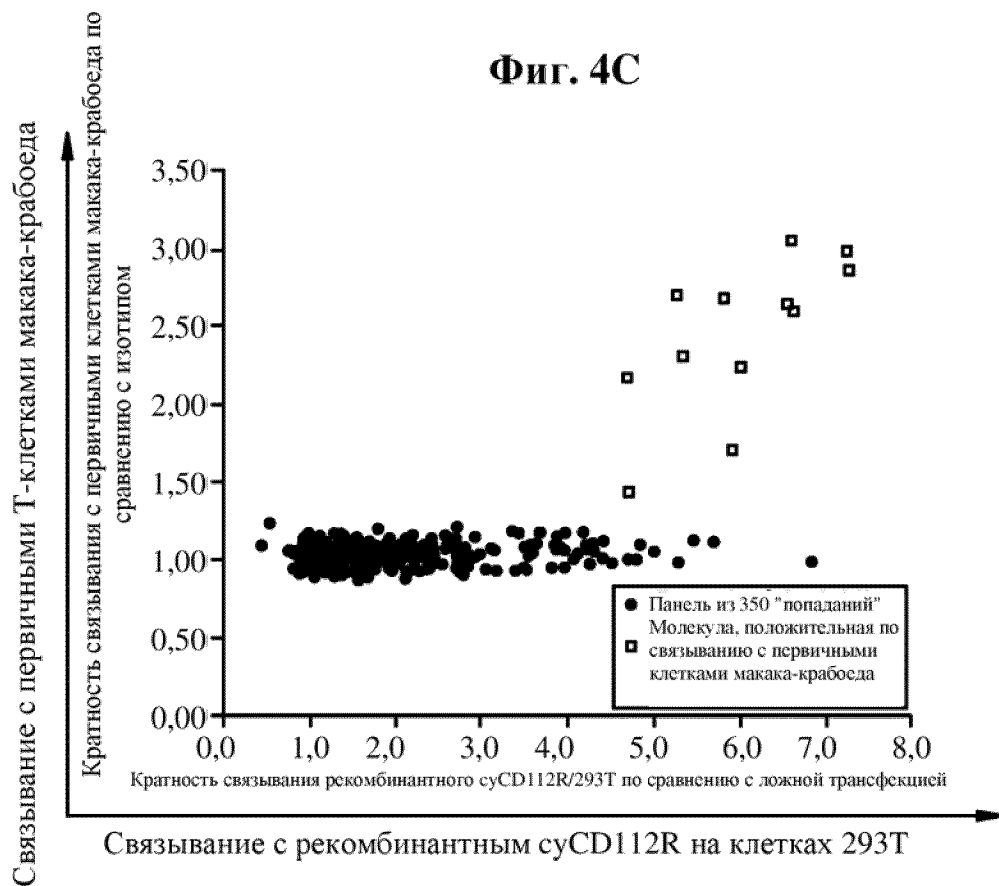




Фиг. 4В



Фиг. 4С



Фиг. 5А

Таблица 1А – цикл 1 – иммунизации Xenomouse

Кампания и сбор	Линия	Иммуноген	huCD112R/293T, "попадания" Ag+, ранние первичные клетки	Функциональные "попадания" (репортерный анализ CD112R с клетками Jurkat)	Рекомбинантный суCD112R/293T	Молекулы, связывающиеся с суCD112R на первичных клетках
Сбор 1	XMG2/XMG4	ДНК	216	216	138	1
Сбор 2	XMG2kl	Растворимый	539			1
Сбор 3	XMG2/XMG4	ДНК и растворимый	469		136	0

Су = яванский макак; hu = человек

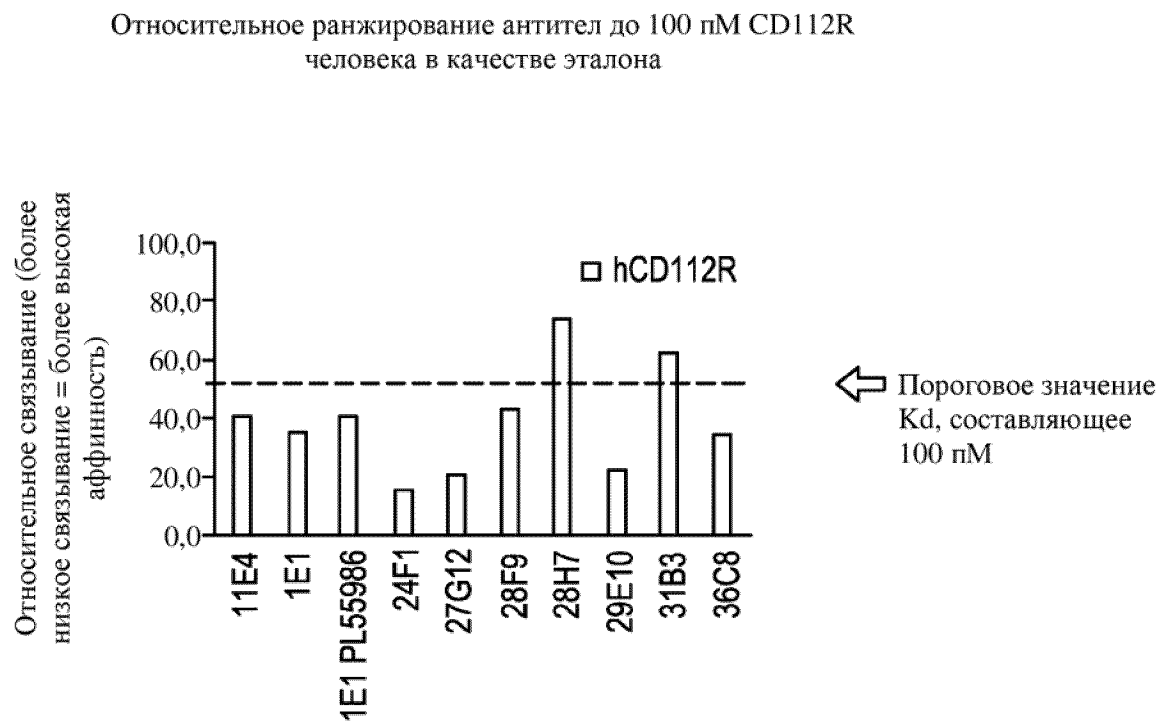
Фиг. 5В

Таблица 1В – цикл 2 – CD112R КО и расширенные процедуры иммунизации Xenomouse

Гибридные пулы HUcd112R	Линия	Количество животных	Иммуноген	huCD112R/293T, "попадания" Ag+, ранние первичные клетки	Функциональные "попадания" (репортерный анализ CD112R с клетками Jurkat)	Рекомбинантный суCD112R/293T	Молекулы, связывающиеся с суCD112R на первичных клетках
Сбор 6	XMG2 CD112R KO	1	Растворимый	887	323	86	4
Сбор 7	XMG2kl	12	ДНК	308	13	220	23
Сбор 8	XMG2 CD112R KO	9	ДНК	51	10	18	0
Сбор 9	XMG2 CD112R KO	3	Растворимый	59	4	12	0

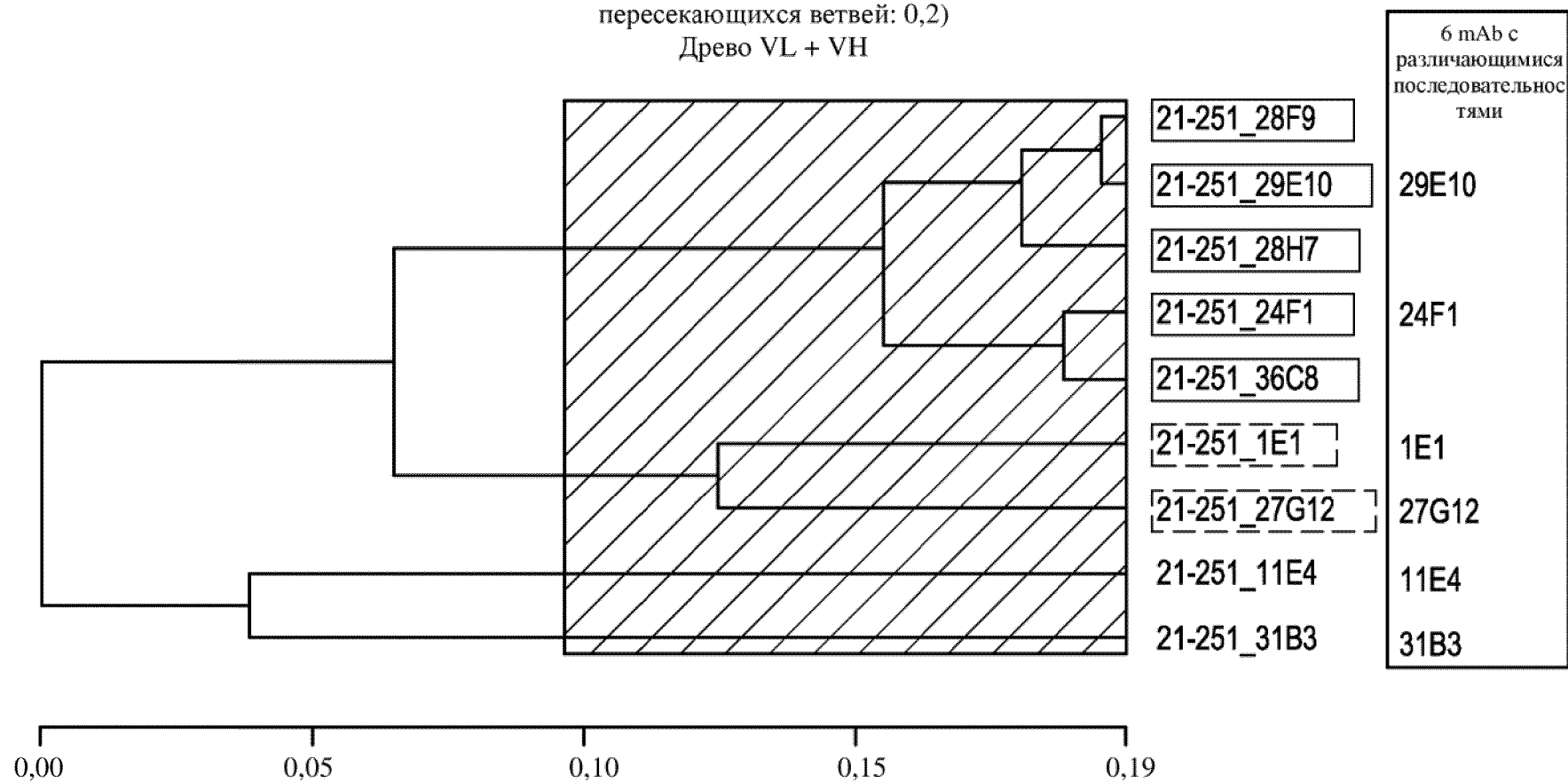
Су = яванский макак; hu = человек; КО = нокаут

Фиг. 6



Фиг. 7А

Результаты распределения покладам (предел длины
пересекающихся ветвей: 0,2)
Древо VL + VH

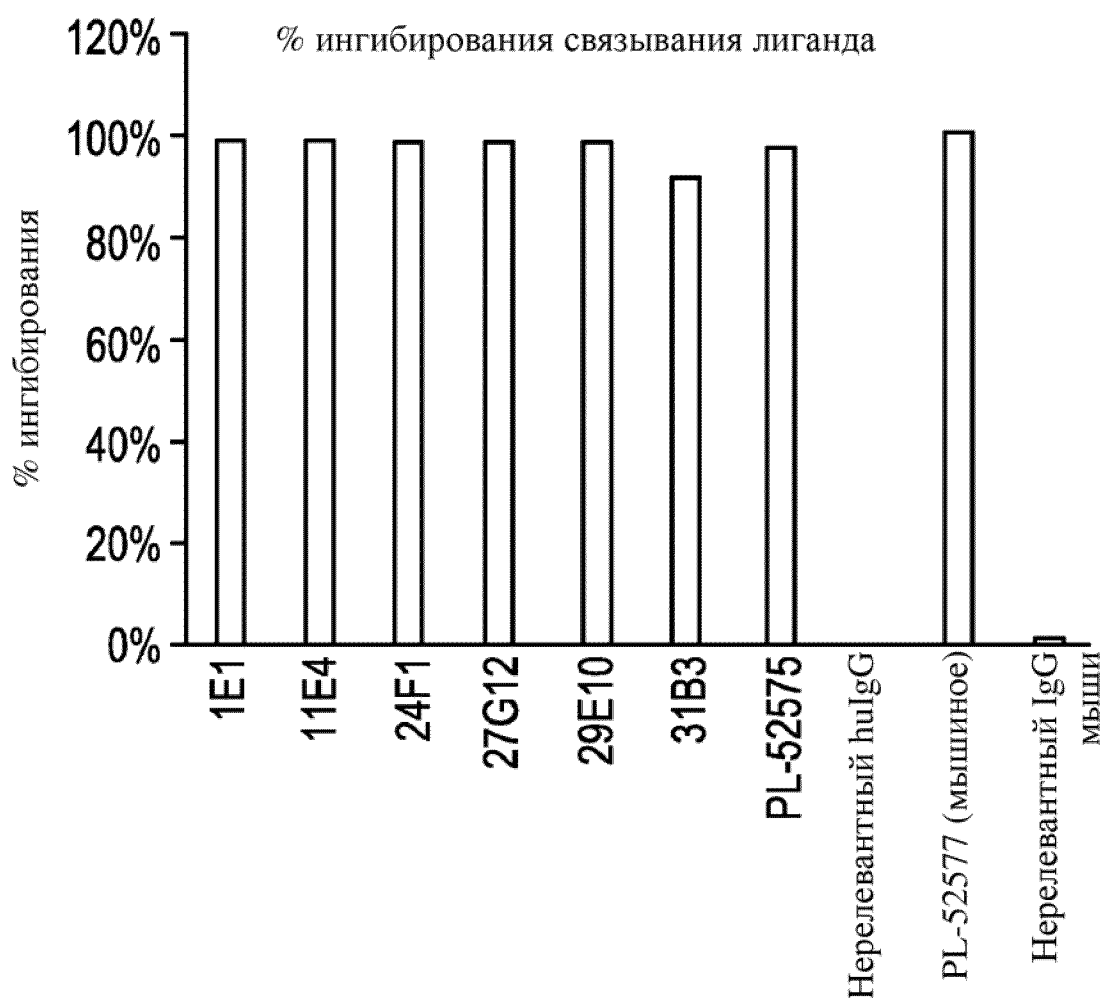


Фиг. 7В

RGA CD112R с клетками Jurkat				Разнообразие последовательностей	
ID лунки	EC50 [нМ] N = 1	EC50 [нМ] N = 2	EC50 [нМ], среднее значение	VH зародышевого типа	CDR3 HC
1E1	3,1	nd	nd	VH1 1-02/D5 5-18 RF1/JH6	EDNFN-----GMDV
18C10	2,9	3,0	2,9	VH1 1-02/D5 5-18 RF1/JH6	EDNFN-----GMDV
11E4	6,4	5,0	5,7	VH4 4-30.1/D7 7-27 RF2/JH6	DLDYDILTY-----PRWDYGMDV
RGA CD112R с клетками Jurkat				Разнообразие последовательностей	
ID лунки	EC50 [нМ] N = 1	EC50 [нМ] N = 2	EC50 [нМ], среднее значение	VH зародышевого типа	CDR3 HC
27G12	4,7	5,5	5,1	VH1 1-08/D5 5-24 RF2/JH6	ERFPF-----GMDV-
28H7	4,9	6,8	5,9	VH3 3-13/D1 1-1 RF1/JH6	EEFGH-----GMDV-
29E10	3,4	6,3	4,9	VH3 3-13/D1 1-1 RF1/JH6	EEFGY-----GMDV-
28F9	6,2	7,0	6,6	VH3 3-13/D1 1-1 RF1/JH6	EEFGN-----GMDV-
31B3	5,5	8,2	6,9	VH3 3-30.3/D3 3-3 RF3/JH6	EIFGESY-----YYGMDV-
24F1	3,4	4,8	4,1	VH3 3-13/D1 1-1 RF1/JH4	EGQVAL-----RYGRL-
36C8	5,8	8,1	7,0	VH3 3-13/D6 6-19 RF3/JH6	EGQWP-----YGMDV-

19/74

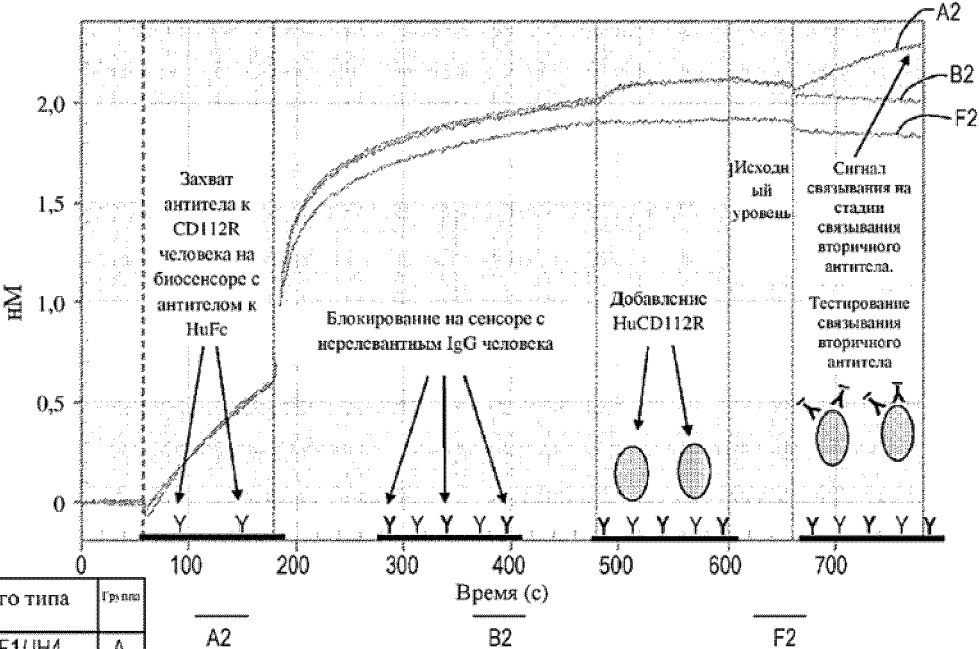
Фиг. 8



IC50	PL-52575	PL-52577
нг/мл	17,8	14,7
нМ	0,12	0,10
Макс. % ингибирования	98%	100%

Фиг. 9А

A2 = 24F1 + 31B3
B2 = 31B3 + 31B3
F2 = IgG2 + 31B3



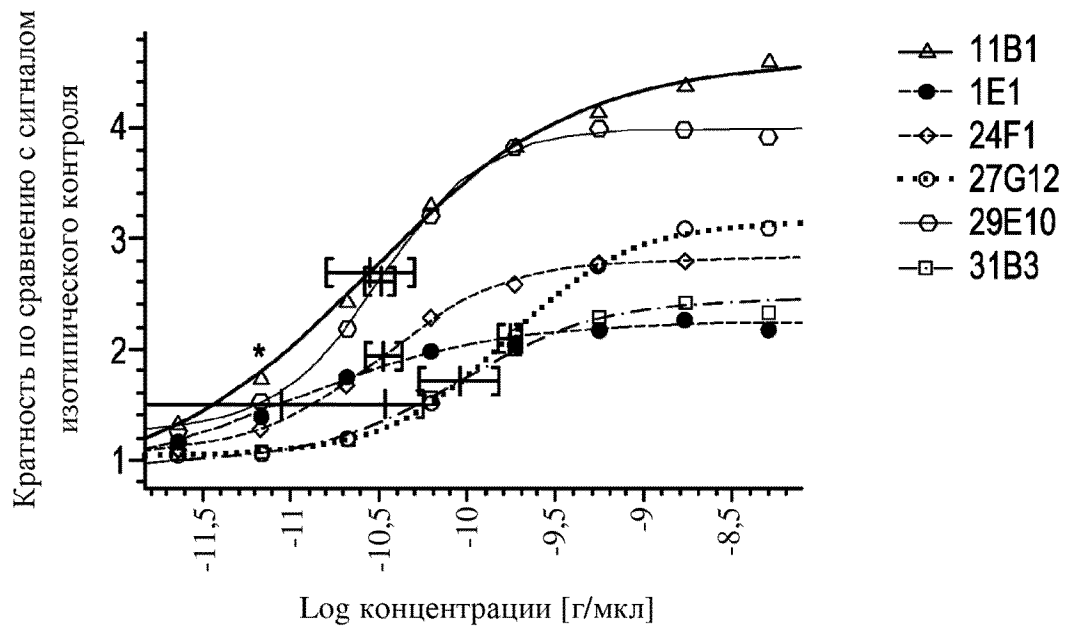
Фиг. 9В

ID антитела	VH зародышевого типа	Группа
24F1	VH3 3-13/D1 1-1 RF1/JH4	A
27G12	VH1 1-08/D5 5-24 RF2/JH6	A
29E10	VH3 3-13/D1 1-1 RF1/JH6	A
1E1	VH1 1-02/D5 5-18 RF1/JH6	A
11E4	VH4 4-30.1/D7 7-27 RF2/JH6	A
31B3	VH3 3-30.3/D3 3-3 RF3/JH6	B

21/74

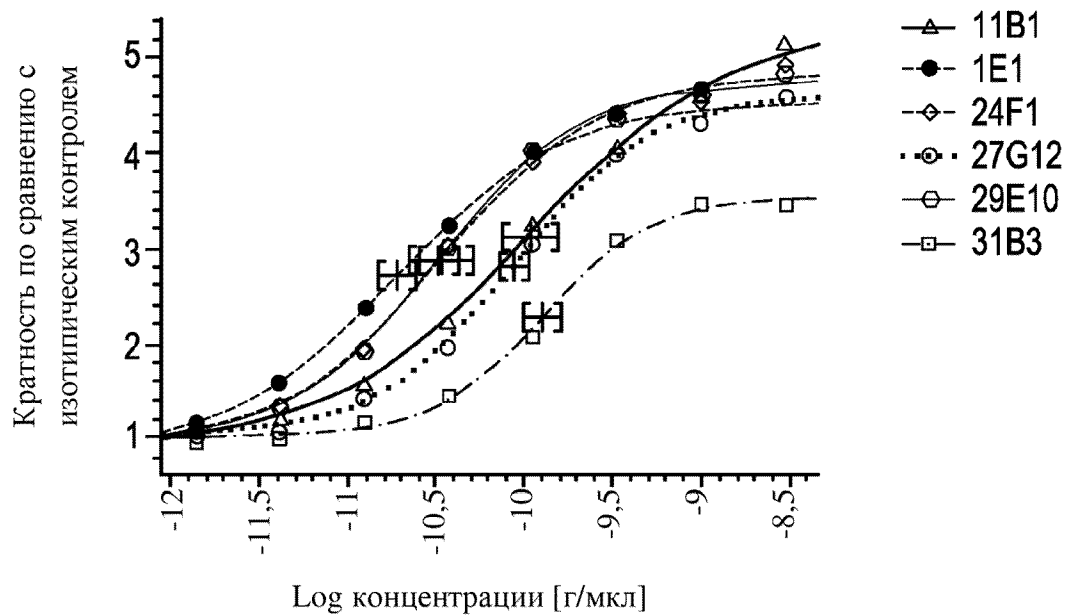
Фиг. 10А

Связывание с РВМС макака-крабоеда



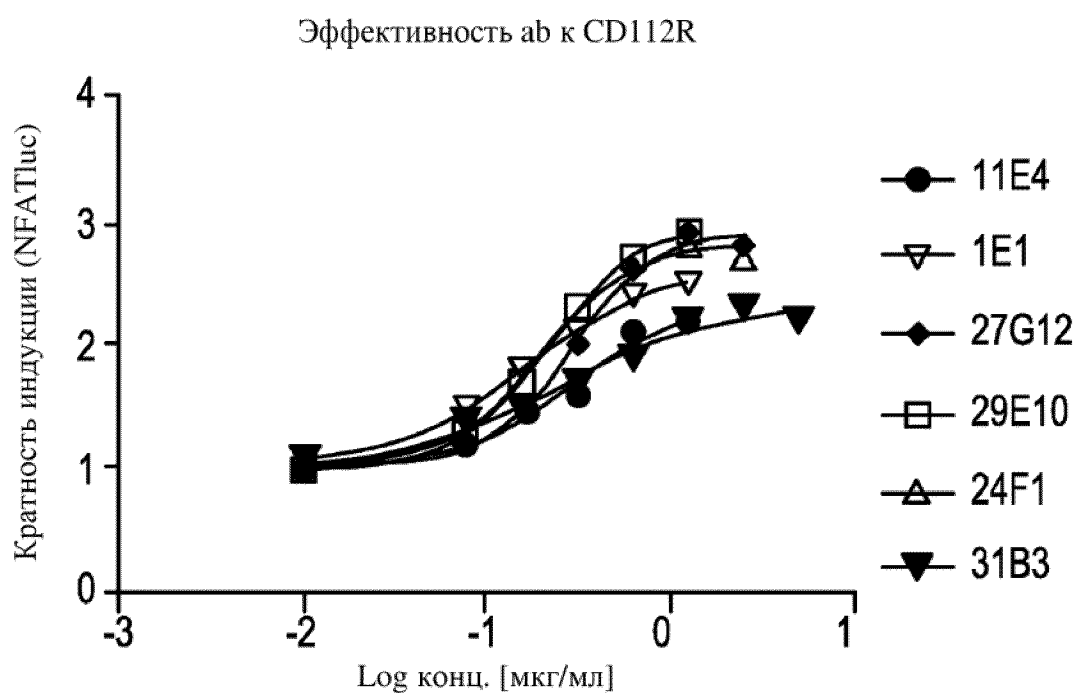
Фиг. 10В

Связывание с Т-клетками человека



22/74

Фиг. 11А

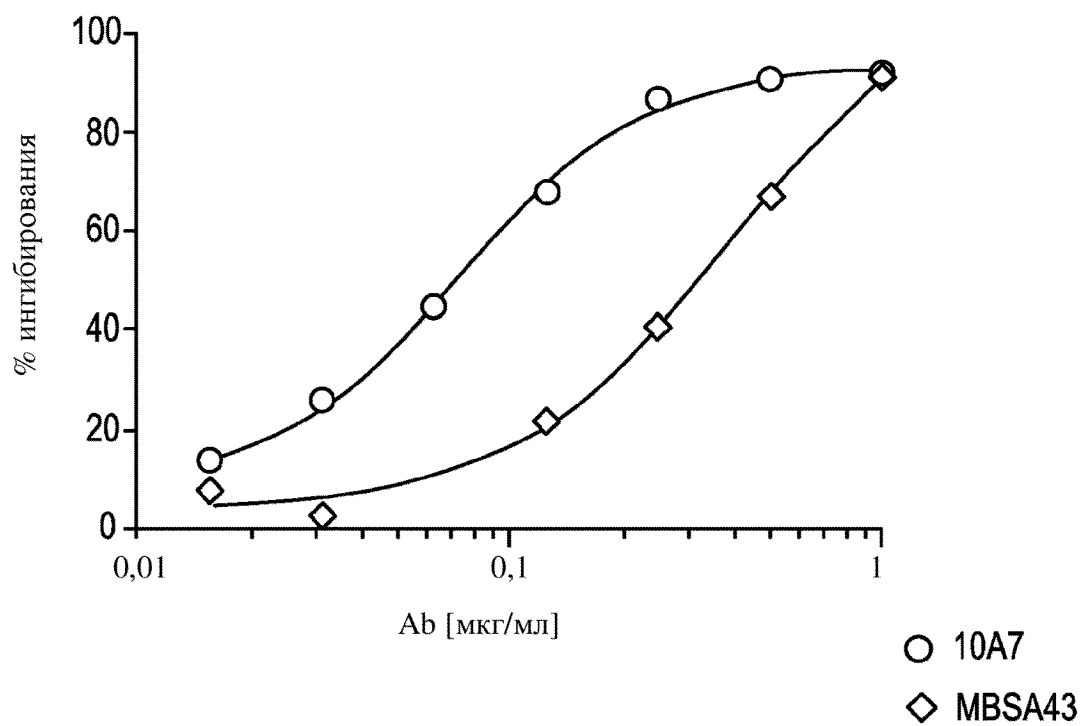


Фиг. 11В

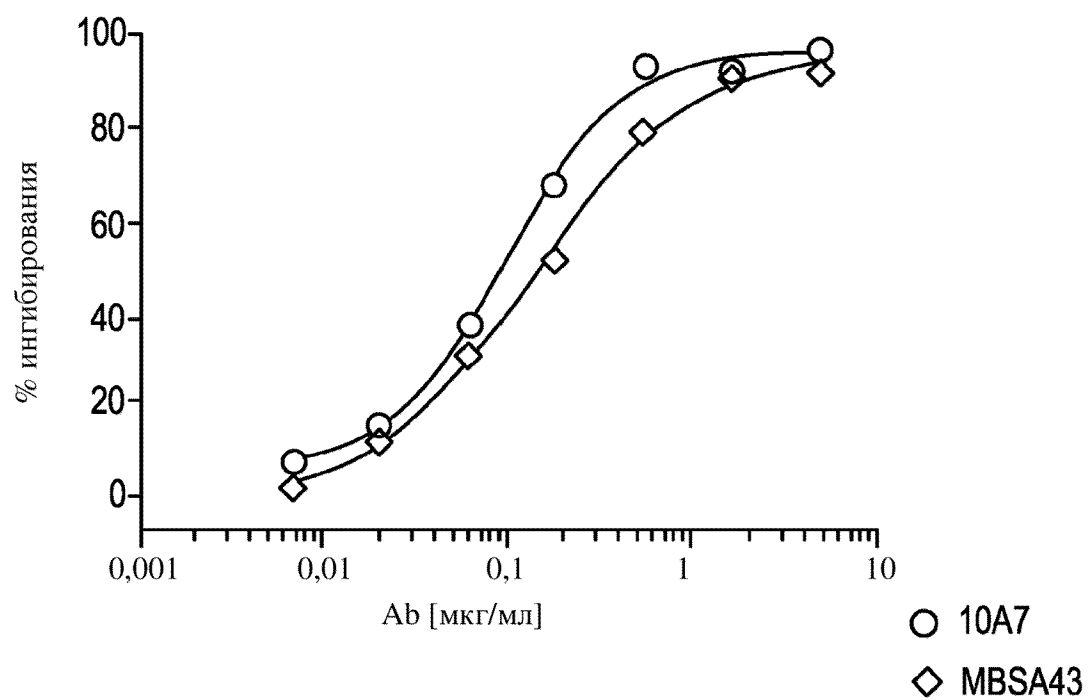
Антитело	Результаты RGA-анализа с клетками Jurkat, интерполированные при 1,9-кратном значении EC50 (нМ)
11E4	3,2
1E1	1,3
27G12	1,8
29E10	1,3
24F1	1,3
31B3	3,5

23/74

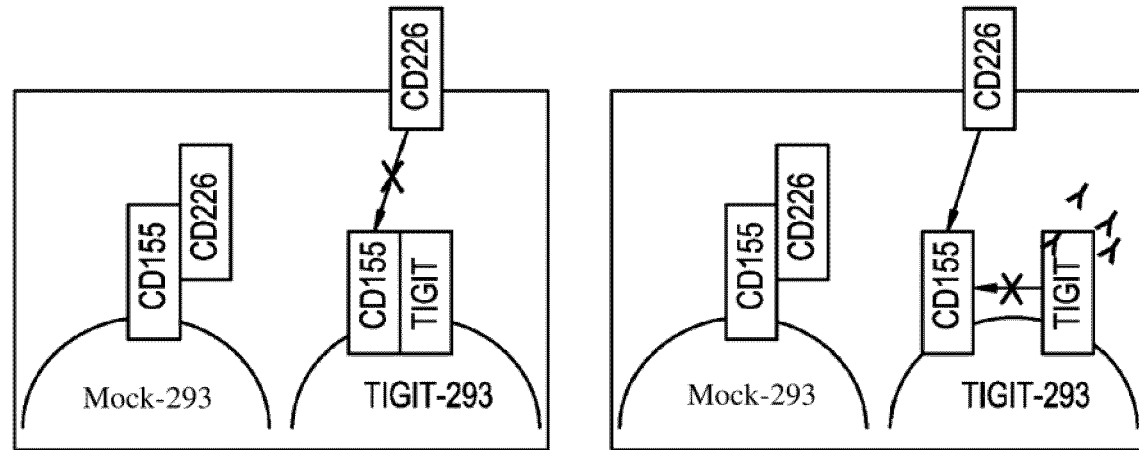
Фиг. 12А



Фиг. 12В



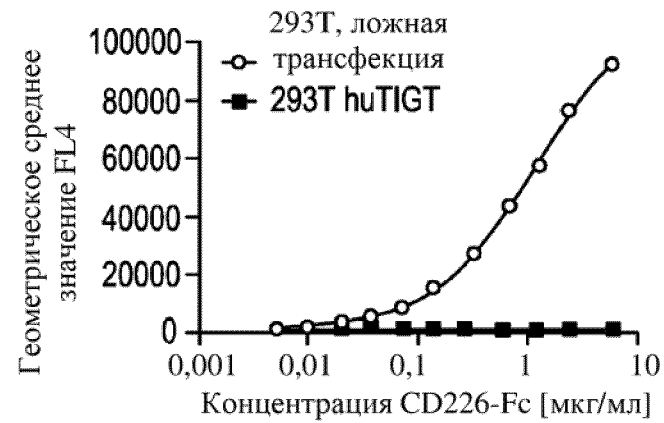
Фиг. 12С



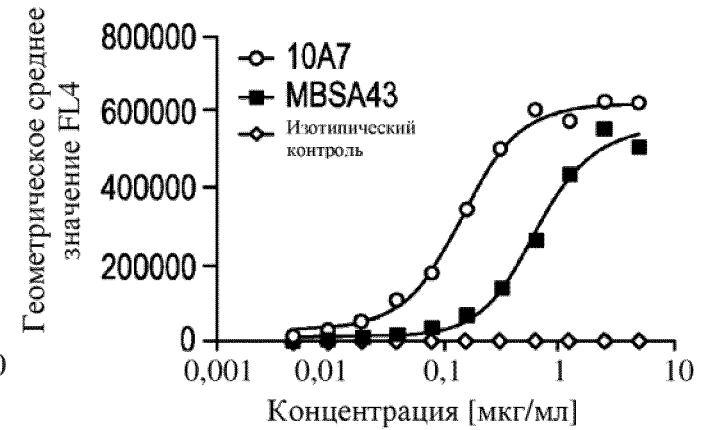
Без инструментальных антител к TIGIT TIGIT связывается с CD155

С инструментальными антителами к TIGIT (зеленые Y) TIGIT не может связываться с CD155

Фиг. 12D

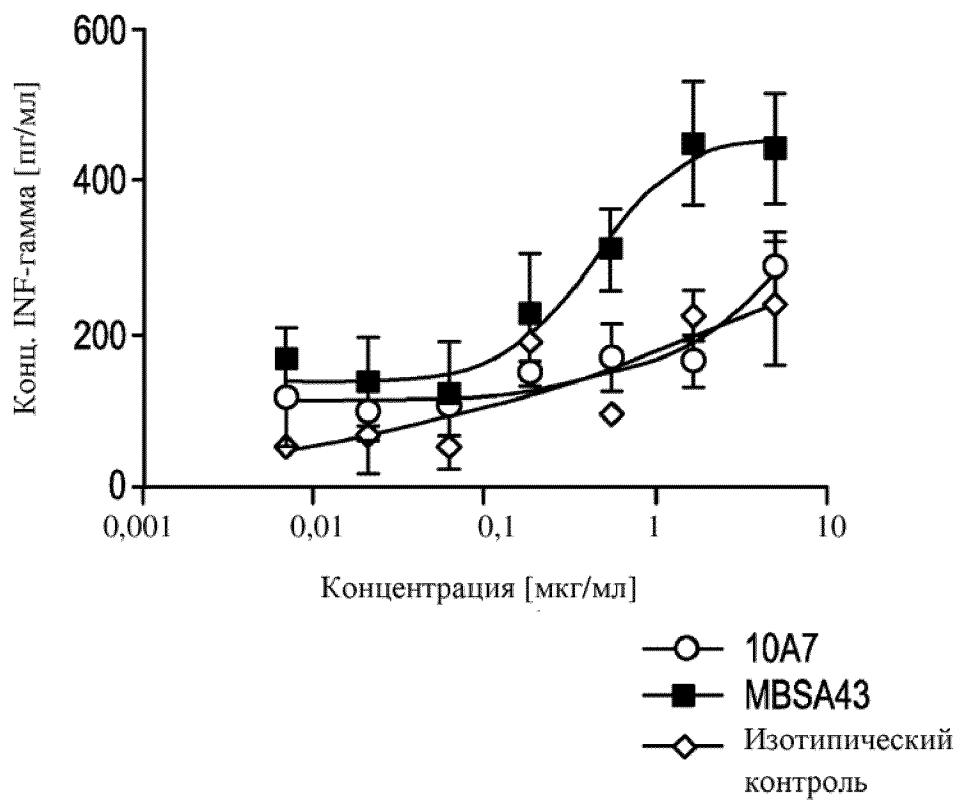


Фиг. 12Е

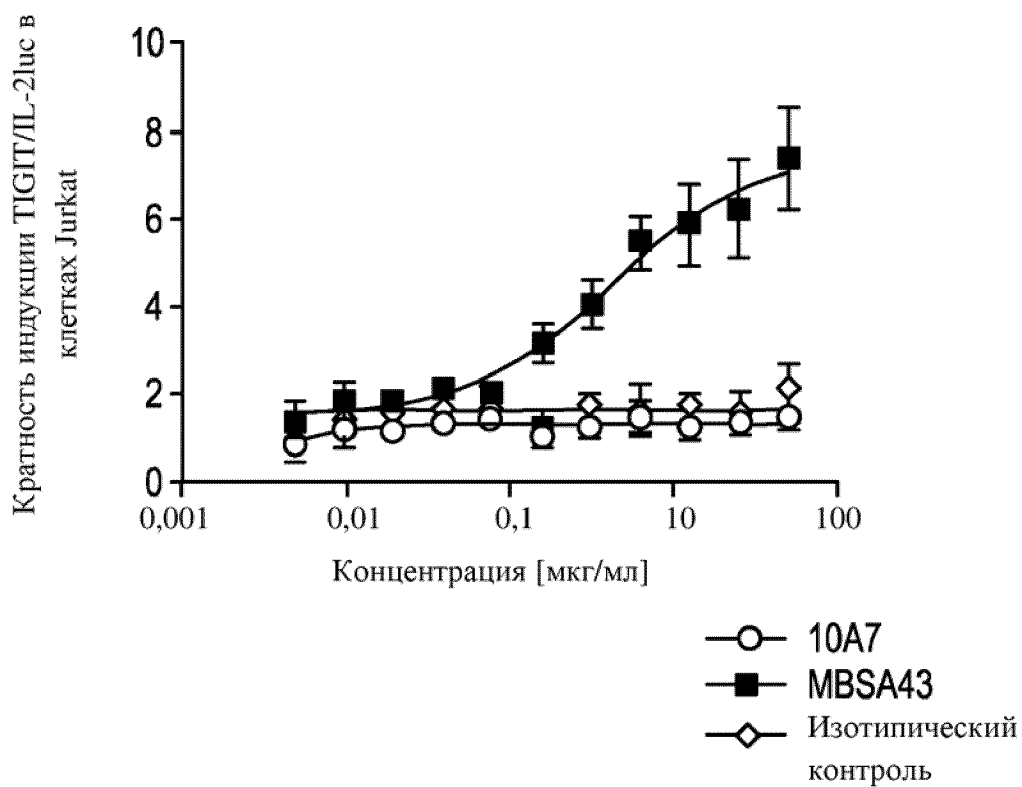


25/74

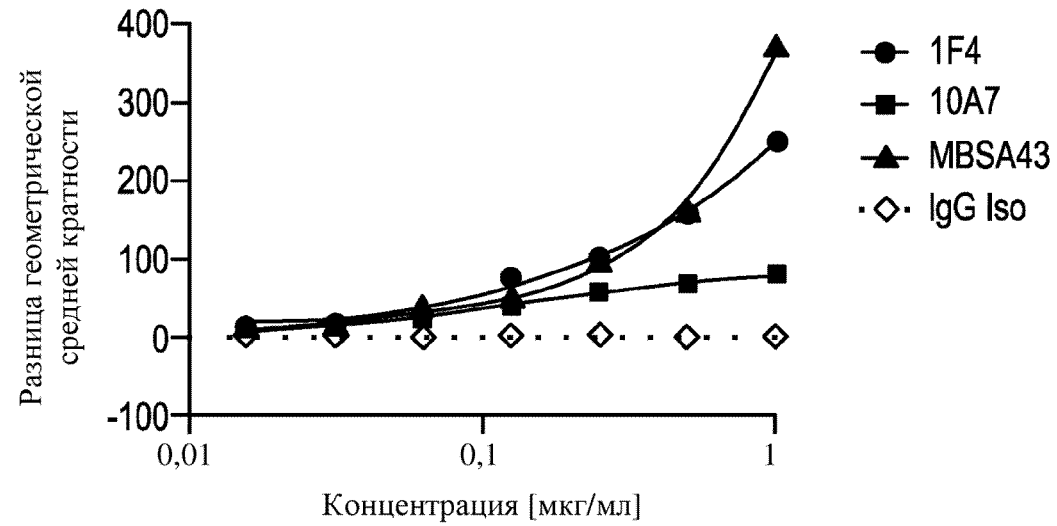
Фиг. 12F



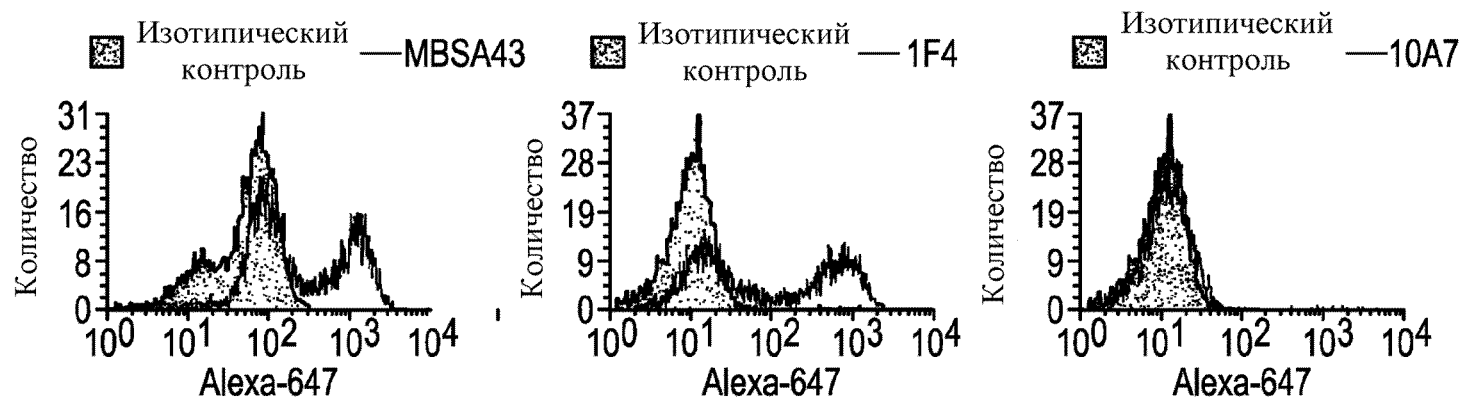
Фиг. 12G



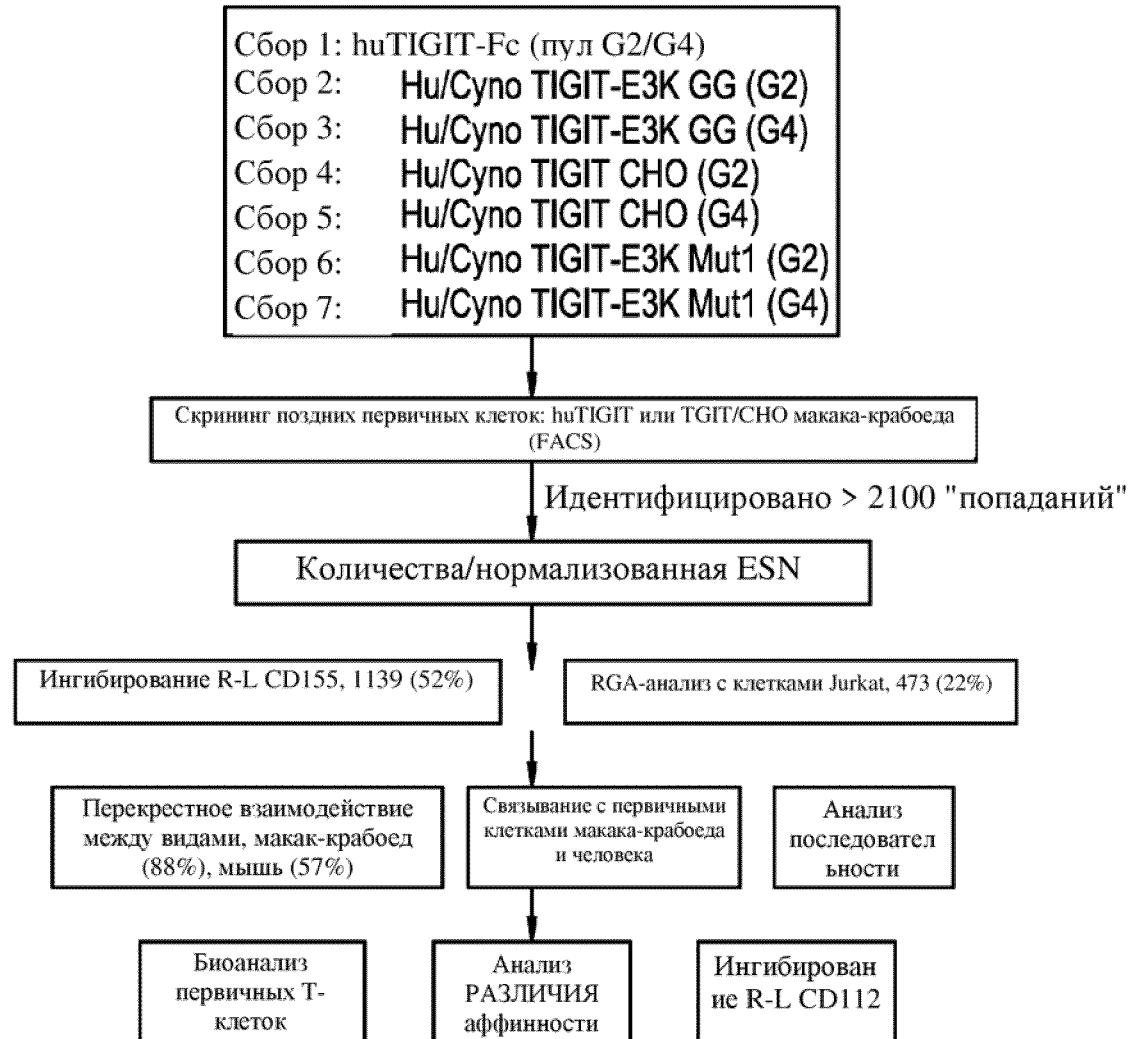
Фиг. 12Н



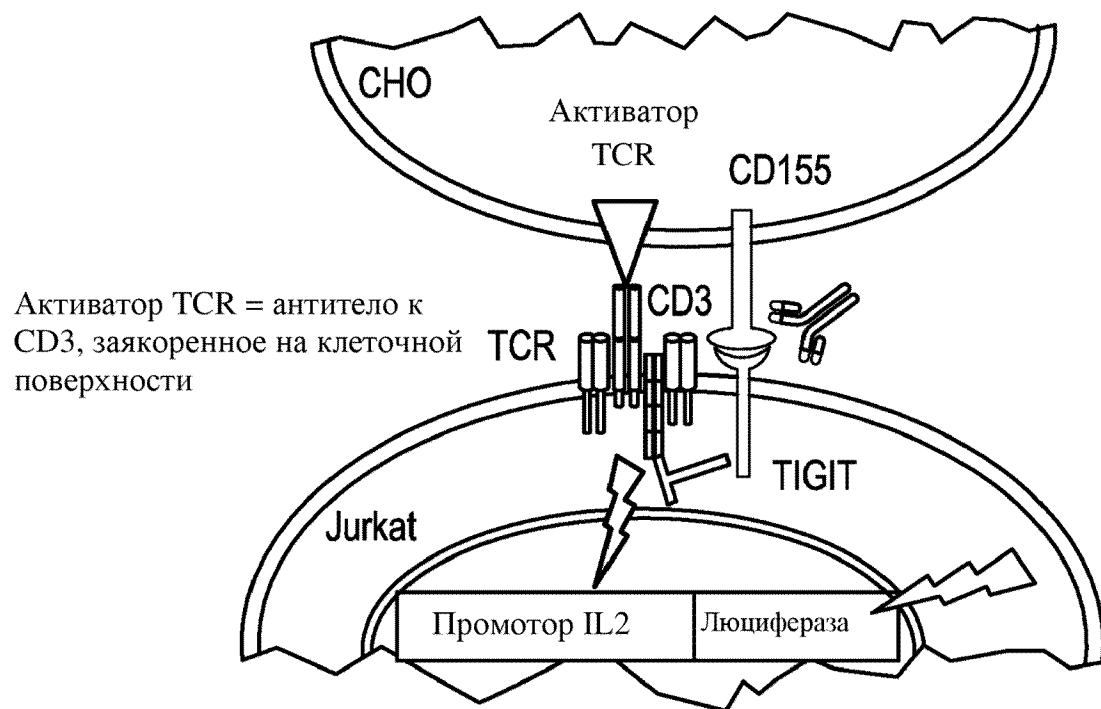
Фиг. 12I



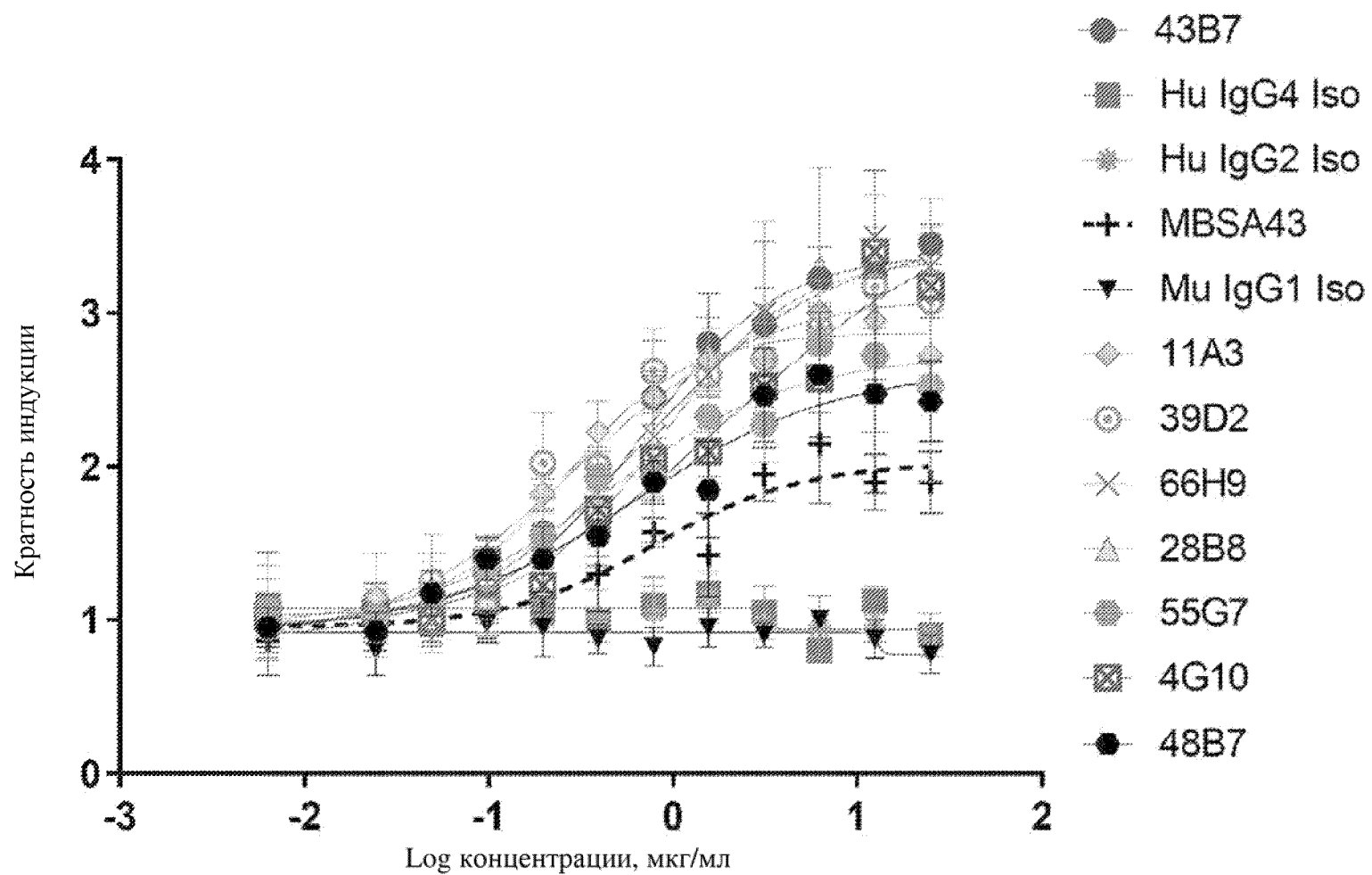
Фиг. 13



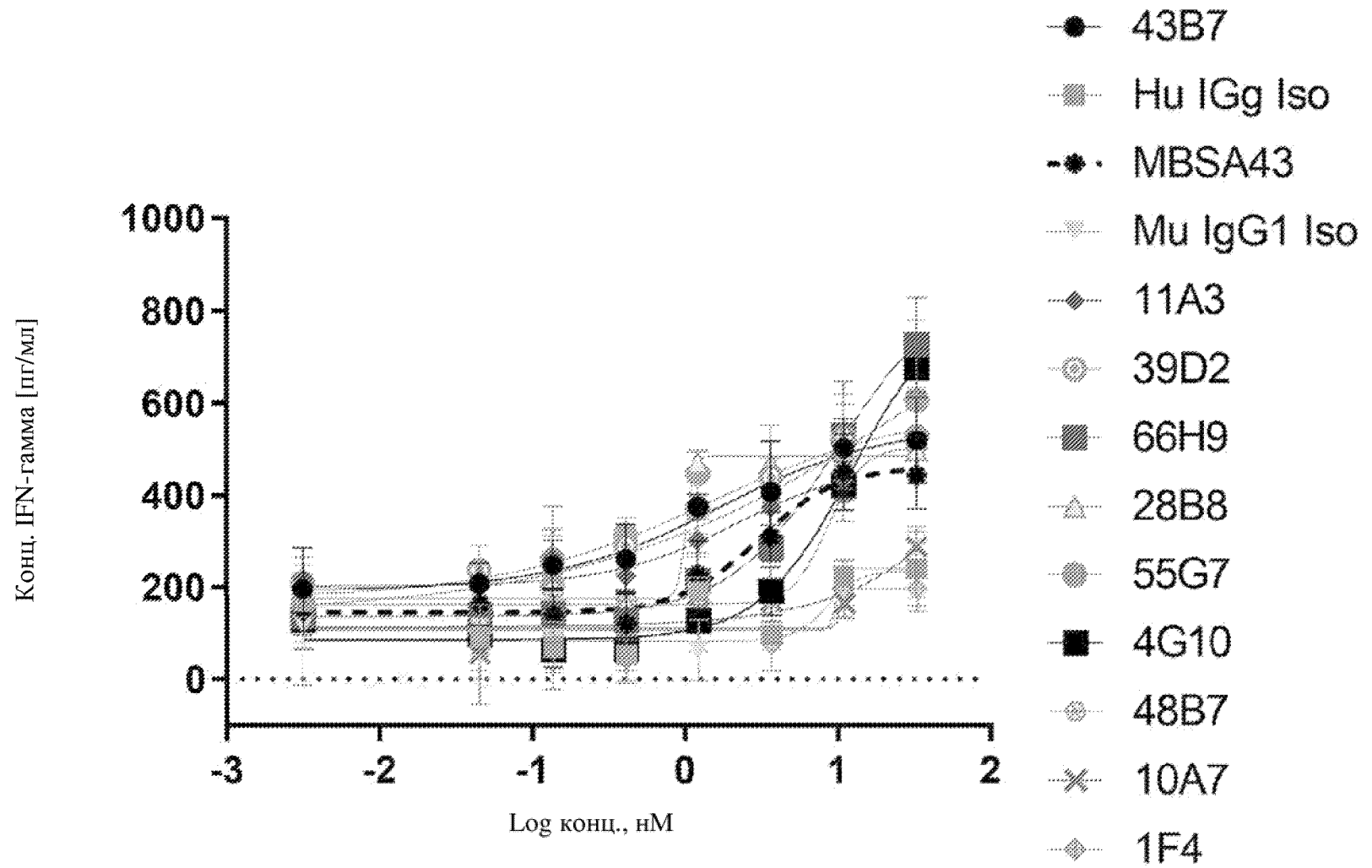
Фиг. 14А



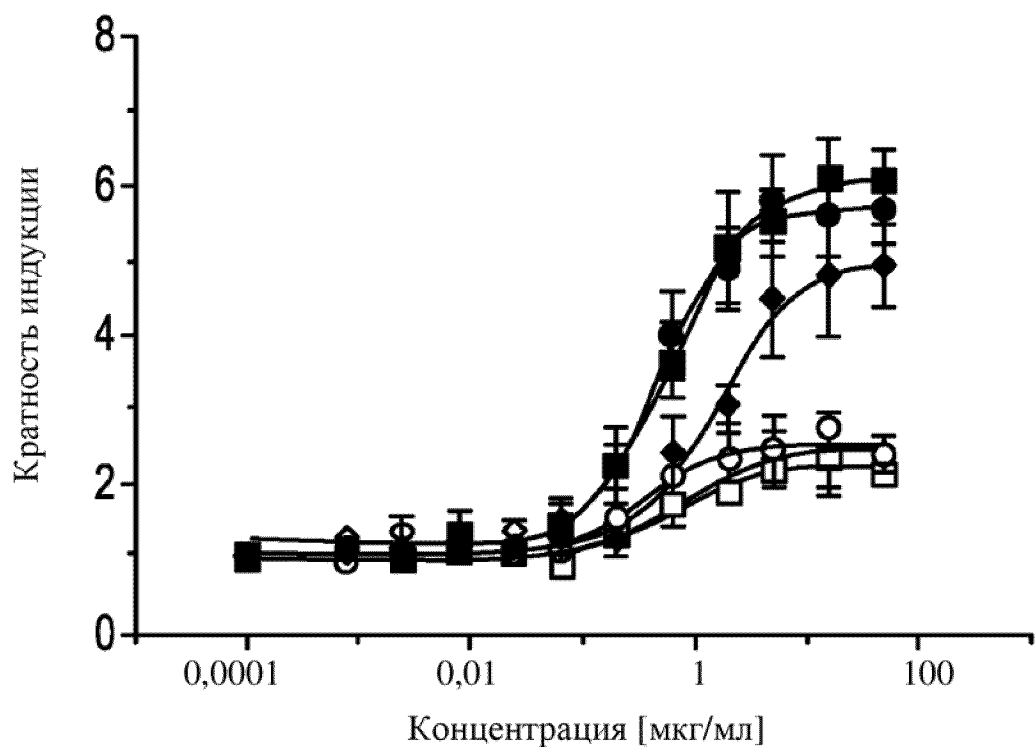
Фиг. 14В



Фиг. 14С



Фиг. 15

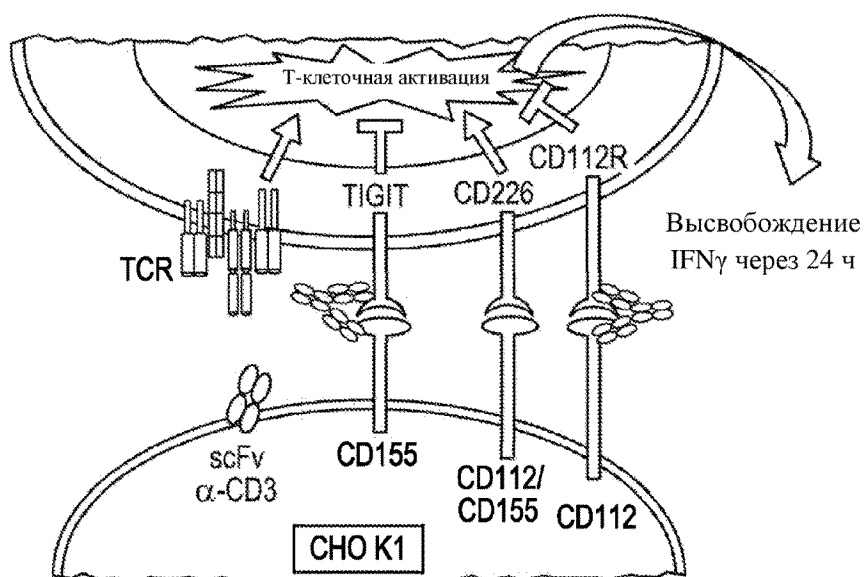


- AB1 + Jurkat IL-2luc/TIGIT
- AB2 + Jurkat IL-2luc/TIGIT
- ◆— MBSA43 + Jurkat IL-2luc/TIGIT
- AB1 + Jurkat IL-2luc/TIGIT/CD226KO
- AB2 + Jurkat IL-2luc/TIGIT/CD226KO
- ◇— MBSA43 + Jurkat IL-2luc/TIGIT/CD226KO

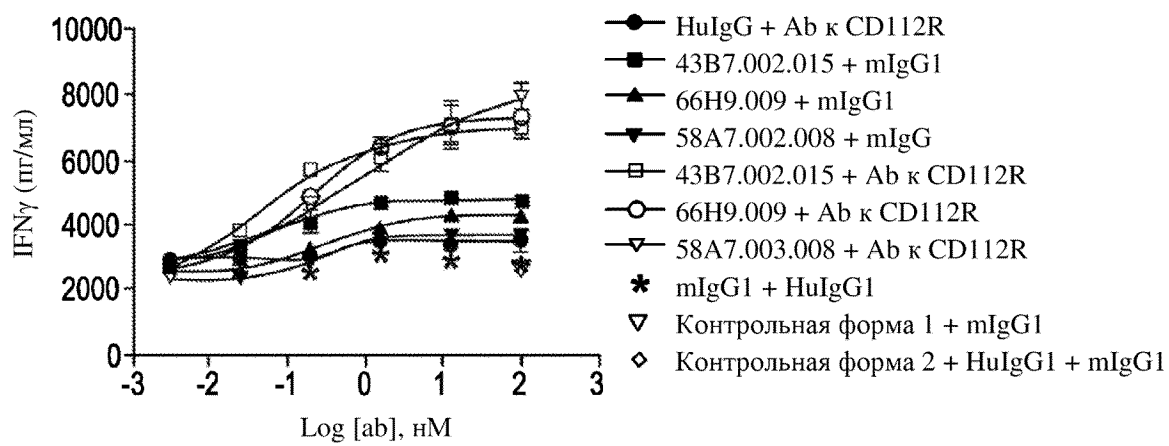
AB1=43B7.002.015

AB2=66H9.010

Фиг. 16А

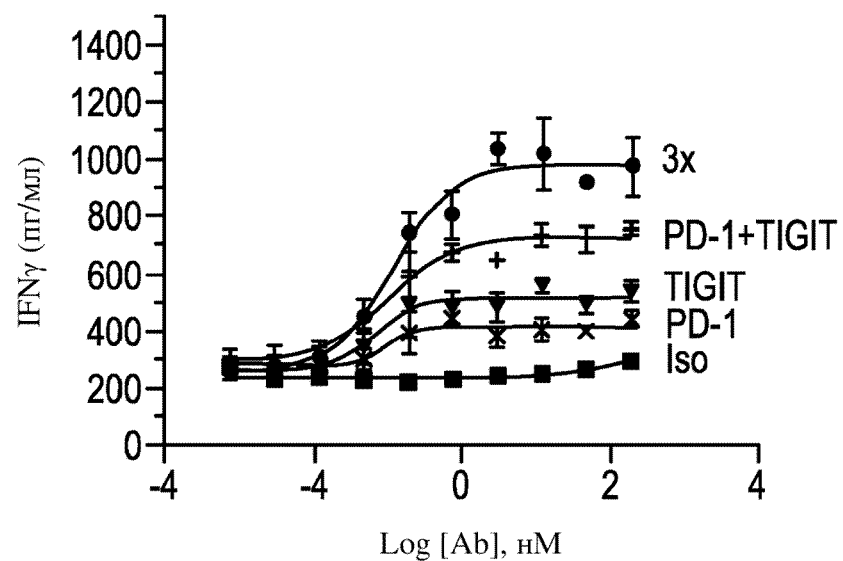


Фиг. 16В



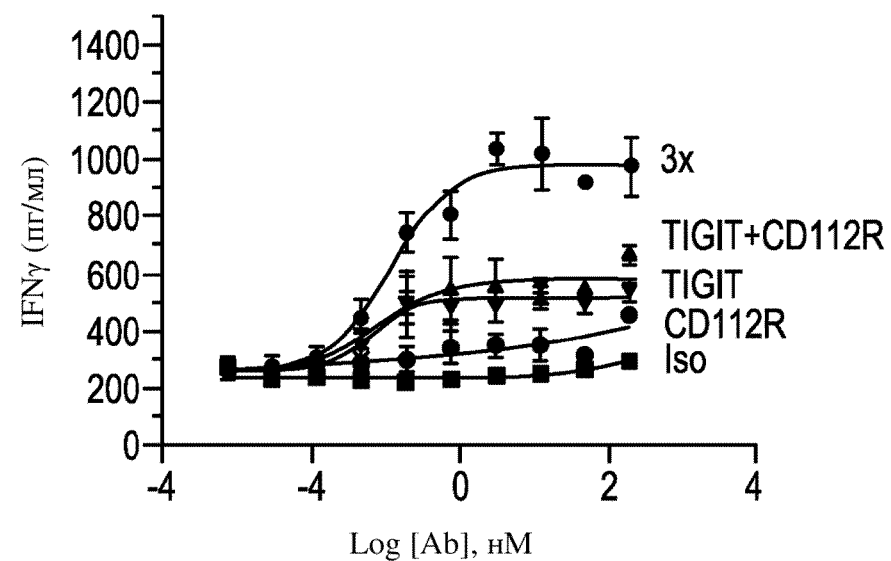
Фиг. 17А

Тройная блокада по сравнению с
PD-1 + TIGIT



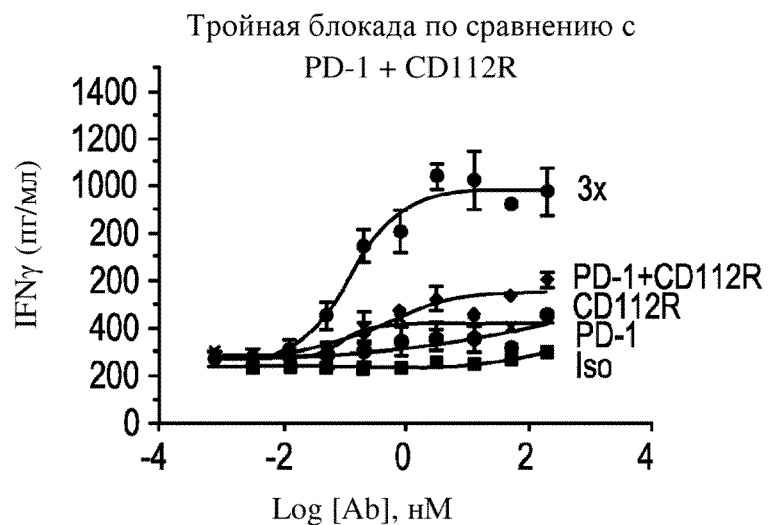
Фиг. 17В

Тройная блокада по сравнению с
TIGIT + CD112R



Ab:
PD-1 = Nivo
TIGIT = 43B7.002
CD112R = PL-52577
Формат анализа: повторный анализ pp65
CMV

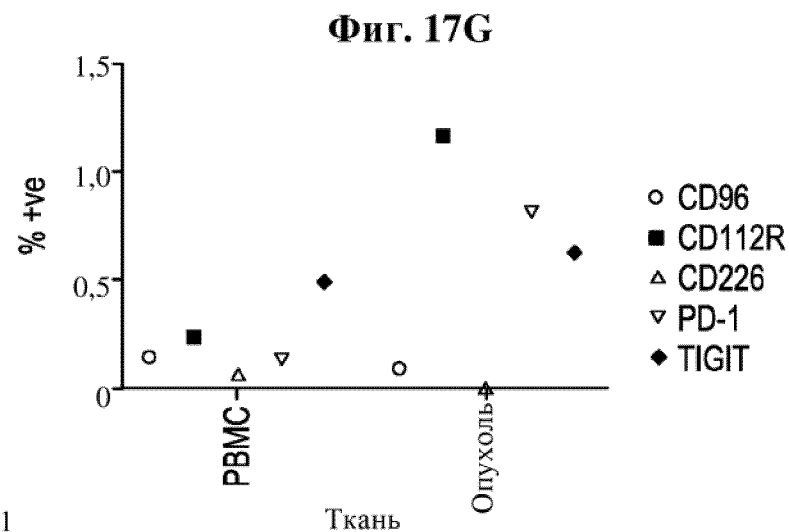
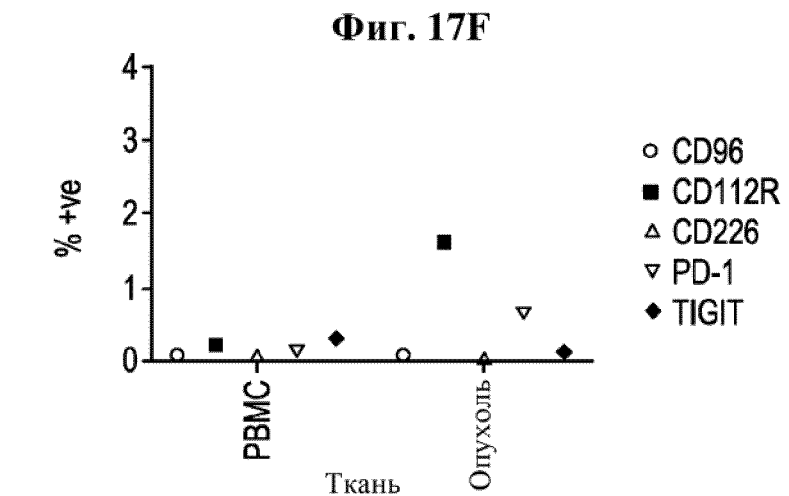
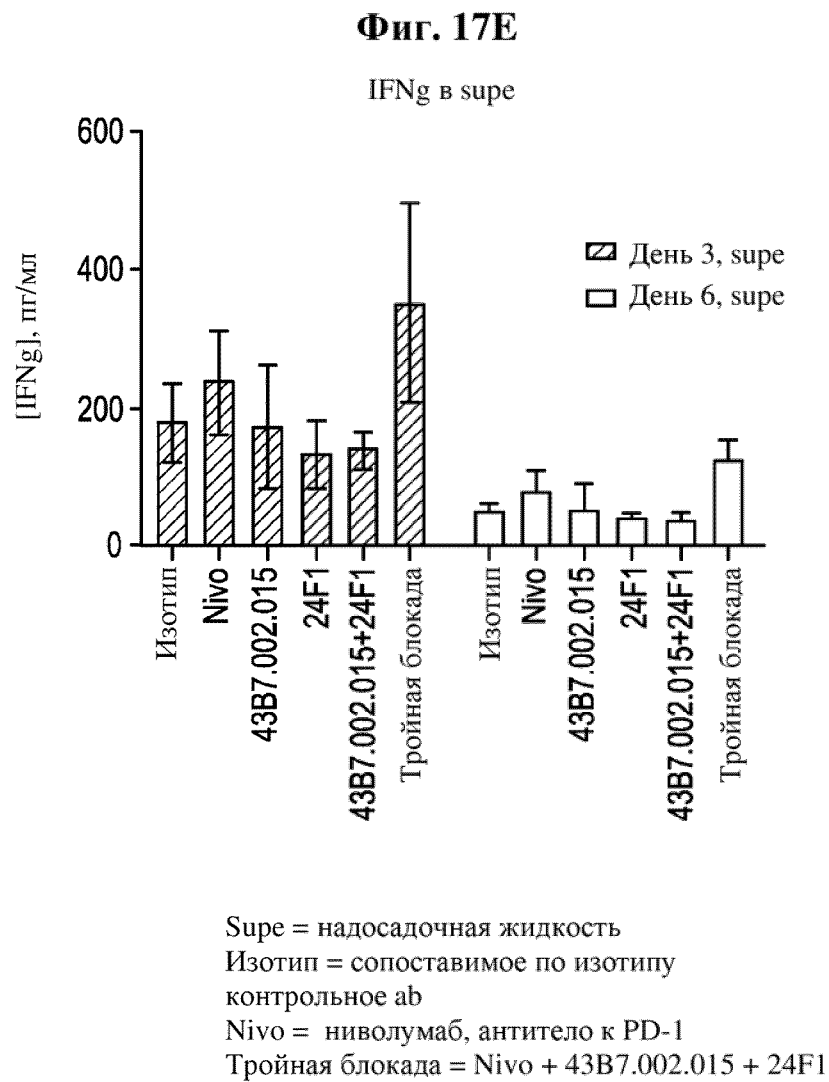
Фиг. 17C



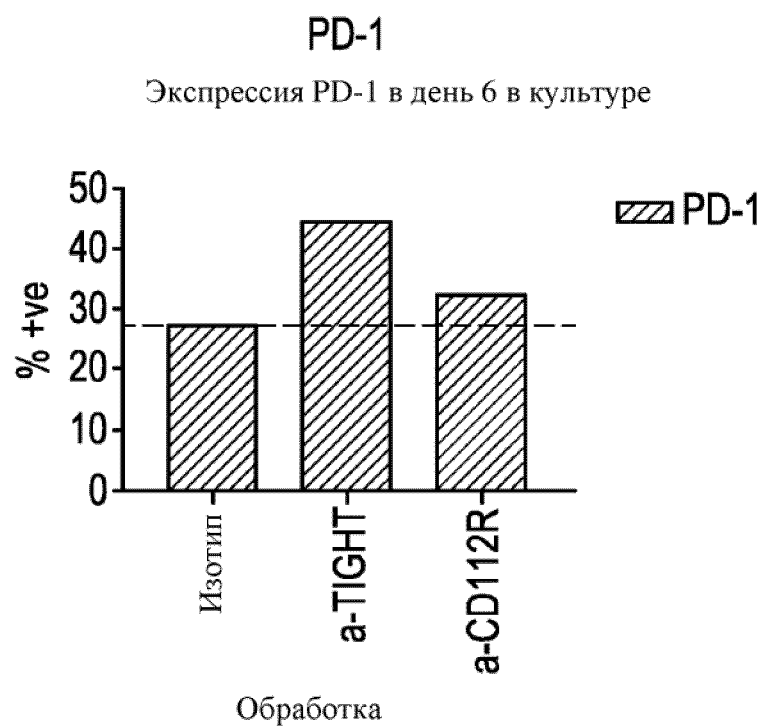
Фиг. 17D



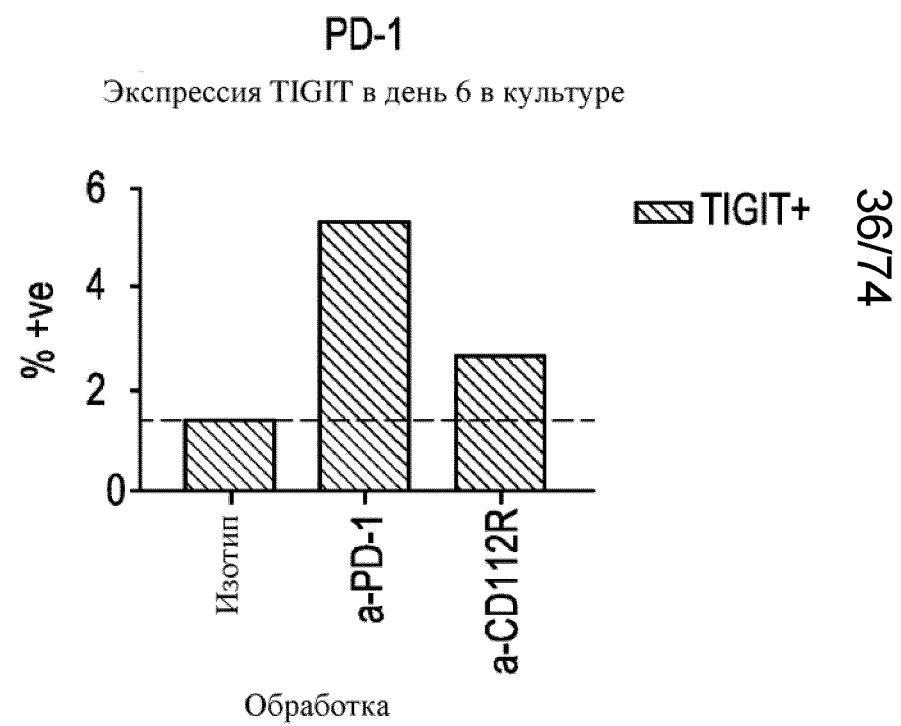
Ab:
 PD-1 = Nivo
 TIGIT = 43B7.002
 CD112R = PL-52577
 Формат анализа: повторный анализ pp65
 CMV



Фиг. 17H



Фиг. 17I



ФИГУРА 18

Таблица 2. Конструирование CD112R с определением горячих точек

Наименование	Средн. знач. EC50 (нМ) перехода, определенное посредством RGA с клетками Jurkat	Титр (мг/л)	Выделение (мг/л)	пре-MP SEC (%)	MP MCE NR (%)	Tm1 (°C)	Tagg (°C)
1E1	1,11	557	546	9	95,6	71,1	71,7
1E1.001	1,18	682	538	9	93,4	69,3	70,2
1E1.002	1,12	1084	569	8	93,9	69,3	70,1
1E1.003	1,47	1600	554	10	93,2	70,6	71,2
1E1.004	1,16	1010	577	9	94,3	nd	nd
1E1.005	1,00	987	562	8	95	69,8	70,4
1E1.006	1,13	886	538	7	94,6	69	70,4
1E1.007	1,51	1186	562	8	95,7	71	71,4
1E1.008	1,17	608	515	8	95,4	71,1	71,7
1E1.009	1,34	453	500	7	97	66,6	67,9
1E1.010	1,57	1154	554	7	96,3	66,7	67,8
1E1.011	1,88	1237	508	7	97,5	67,6	68,3
1E1.012	1,14	1139	462	6	97,1	67,8	67,4
1E1.013	0,92	987	562	7	94,6	67,5	68,5
1E1.014	1,04	1158	531	7	95,7	67,6	68,5
1E1.015	1,33	581	531	8	95,1	68,5	69,3
1E1.016	0,98	676	531	7	95,4	68,6	69,4
1E1.017	2,01	523	538	8	94,8	69,1	70
1E1.018	1,40	521	400	6	96,6	69	70,2
1E1.019	4,97	1355	554	9	95,1	70,2	70,9
1E1.020	1,55	573	546	9	95,1	70,3	70,9
1E1.021	1,99	555	523	7	96,4	69,5	70,3
1E1.022	1,43	398	308	5	94,9	69,5	70,5
1E1.023	7,23	535	531	8	95,4	70,8	71,4
1E1.024	1,61	606	569	8	97	70,8	71,6
1E1.025	2,00	514	492	5	96,7	66,2	67,8
1E1.026	1,56	512	546	5	97	66,2	67,4
1E1.027	4,52	515	485	4	97,5	67,1	68,2
1E1.028	1,96	675	492	4	97,4	67,2	68,3
1E1.029	2,39	636	538	5	96,3	67,1	68,2
1E1.030	1,80	531	500	6	97,5	67,3	68,4
1E1.031	6,22	789	515	5	98,2	68,1	69,1
1E1.032	2,07	611	531	5	98,1	68,2	69,2
1E1.049	5,21	850	600	8	97,9	72,4	72,7
1E1.050	7,27	1005	577	8	97,8	71,7	71,9
1E1.052	0,97	954	562	10	93,6	71,8	72,4
1E1.055	2,13	545	531	7	94,8	70,1	70,8
1E1.056	1,45	1038	562	8	95,8	71,3	72

ФИГУРА 18 (продолжение)

11E4	1,06	938	492	1	98,2	70,8	72
11E4.003	3,99	645	431	3	98,3	66,6	68,6
11E4.004	4,50	357	308	1	98,3	66,8	69,1
11E4.005	9,81	777	469	3	97,8	70,2	71,2
11E4.006	5,21	794	546	1	97,7	71,5	72,8
11E4.007	4,10	82	123	0	90,3	70,8	74,3
11E4.008	3,49	901	469	2	97,9	74	74,7
11E4.009	3,93	788	523	1	97,8	71,7	73,2

Таблица 3. Конструирование каркаса CD112R (мишень Fv 1 = huCD112R)

Наименование	Средн. знач. EC50, определенное посредством			пре- MP SEC (%)	MP MCE NR (%)	MP SEC, 2wk40C Tm1	MP SEC, 2wk40C	Δ% MP SEC, 2wk40C
	RGA с	Титр (мг/л)	Выделение (мг/л)					
	клетками Jurkat, нМ							
11E4*	1,54	382	308	2,5	98,1	71,3	90,3	-8,8
11E4.002	1,79	479	276	4,2	95,7	64,0	89,9	-2,8
11E4.004	1,00	445	318	2,7	93,8	69,0	89,5	-0,9
11E4.005	1,90	134	104	12,2	94,5			
11E4.006	1,38	479	328	5,4	92,4	71,2	78,8	-8,8
11E4.008	2,39	681	409	4,9	94,3	68,9	93,2	-2,9
11E4.010	2,01	592	425	3,8	96,0	70,5	89,0	-9,0
11E4.011	3,39	301	201	9,9	94,3	72,1	85,2	2,3
11E4.012	2,29	301	237	6,9	95,9	61,4	96,9	2,7
11E4.013	1,48	552	370	5,7	96,1	75,0	83,8	-13,1
11E4.013	1,48	552	370	5,7	96,1	75,0	83,8	-13,1

* использовали в качестве контроля.

ФИГУРА 18 (продолжение)

Таблица 4. Конструирование дрожжевого дисплея CD112R 1

Наименование	Значение EC50 перехода, определенное посредством		RGA CD112R с						MP HT
	клетками Jurkat (нМ)	Выделен ие (мг/л)	пре-MP SEC (%)	MP SEC (%)	MP MCE		HT		SEC (%), 2wk40C
					NR	Tm1	SEC до MP (%)		
24F1_CONS	1,90	338,6	3,92	96,08	89,50	70	90,39	88,2	
29E10_CONS	3,09	342,9	1,43	96,33	98,70	65,8	96,63	93,94	
24F1_CONS.001	2,09	334,3	5,5	94,5	97,31	70,6	90,83	88,66	
24F1_CONS.002	2,93	334,3	5,8	94,2	97,59	69,7	92,75	90,92	
24F1_CONS.003	2,85	342,9	4,77	95,23	92,92	65,6	91,49	89,51	
24F1_CONS.004	1,97	312,9	4,07	95,93	97,55	64,4	93,93	92,38	
24F1_CONS.005	2,11	334,3	3,52	96,48	96,58	63,6	94,4	92,76	
24F1_CONS.006	2,04	338,6	3,55	96,45	97,42	63,6	94,29	92,97	
24F1_CONS.007	2,19	317,1	2,63	97,37	97,55	64,4	95,63	93,83	
24F1_CONS.008	2,07	347,1	7,77	92,23	97,47	68,6	89,7	88,41	
24F1_CONS.009	2,27	304,3	10,63	89,37	97,45	68,6	87,19	86,2	
24F1_CONS.011	2,13	338,6	9,06	90,94	97,53	68,9	88,72	87,32	
24F1_CONS.012	2,66	355,7	8,13	91,87	97,34	68,6	90,14	88,75	
24F1_CONS.013	2,79	325,7	5,99	94,01	97,52	71,9	91,76	89,84	
24F1_CONS.014	2,36	334,3	5,73	94,27	97,55	66,3	92,25	90,86	
24F1_CONS.015	2,62	334,3	7,88	92,12	97,46	71,3	90,21	88,75	
24F1_CONS.016	2,31	338,6	4,54	95,46	97,53	69,2	93,69	91,74	
24F1_CONS.017	1,95	304,3	1,8	98,2	97,44	62,2	96,68	93,81	
24F1_CONS.018	2,44	308,6	6,62	93,38	97,53	69,7	91,74	89,28	
24F1_CONS.019	3,08	334,3	8,98	91,02	97,44	70,8	88,99	87,57	
24F1_CONS.020	2,65	308,6	3,85	96,15	97,53	64,1	94,46	92,6	
24F1_CONS.021	2,16	321,4	4,42	95,58	97,61	69,7	93,33	91,81	
24F1_CONS.022	1,85	342,9	1,97	98,03	97,46	62,1	96,29	94,05	
24F1_CONS.023	1,73	167,1	2,31	97,69	98,07	61	96,46	94,09	
24F1_CONS.024	2,12	282,9	4,09	95,91	97,00	70,5	92,73	90,9	
24F1_CONS.025	2,19	351,4	4,09	95,91	97,16		94,51	92,33	
24F1_CONS.026	2,42	325,7	5,81	94,19	97,40	70,7	93,01	90,99	
24F1_CONS.027	2,38	338,6	4,61	95,39	94,89	69,1	93,88	91,85	
24F1_CONS.028	2,46	330,0	10,94	89,06	97,41	69,2	86,84	85,39	
24F1_CONS.029	2,61	330,0	5,56	94,44	97,17	64,6	92,63	90,81	
24F1_CONS.031	2,97	325,7	4,76	95,24	97,28	61,6	93,81	91,89	
24F1_CONS.032	2,55	308,6	5,78	94,22	97,54	61,6	92,55	90,8	
24F1_CONS.033	2,67	317,1	4,97	95,03	97,50	63,2	93,61	91,71	
24F1_CONS.034	2,70	248,6	6,78	93,22	97,06	67,2	89,52	87,71	
24F1_CONS.035	2,46	231,4	8,29	91,71	97,48	67,9	87,98	87,65	
24F1_CONS.036	2,64	257,1	9,5	90,5	97,33	69,2	87,23	86,18	
24F1_CONS.037	3,39	278,6	11,77	88,23	97,52	68,4	85,13	84,13	

ФИГУРА 18 (продолжение)

24F1_CONS.038	2,52	334,3	3,01	96,99	97,78	61,2	95,29	93,08
24F1_CONS.039	2,43	347,1	4,95	95,05	75,43	59,9	93,32	91,28
24F1_CONS.040	2,93	154,3	4,93	95,07	97,99	57,2	93,16	90,75
24F1_CONS.041	2,73	137,1	6,13	93,87	97,76	56,4	91,76	89
24F1_CONS.042	2,66	287,1	5,9	94,1	97,63	60,7	92,62	90,35
24F1_CONS.043	2,64	291,4	6,08	93,92	97,65	61,2	91,7	90,18
24F1_CONS.044	2,30	287,1	4,31	95,69	97,28	63,4	93,15	91,41
24F1_CDNS.045	2,18	227,1	2,57	97,43	98,08	57,3	95,19	93,15
24F1_CONS.046	1,84	321,4	3,47	96,53	97,21	62,2	94,42	92,39
24F1_CONS.048	2,54	150,0	2,95	96,24	99,29	67,1	93,76	91,62
24F1_CONS.049	3,00	295,7	4,08	93,27	99,18	65,4	92,95	91,17
24F1_CONS.050	2,95	141,4	3,29	95,89	98,83	64,3	92,46	90,69
11E4.009*	4,06	351,4	3,39	96,61	97,01	71,5	95,09	93,25
11E4.084	8,33	330,0	3,78	91,59	97,28	72,7	91,88	88,93
11E4.007*	2,94	390,0	3,6	96,4	96,92	71,1	94,48	95,93
11E4.087	2,35	325,7	4,44	95,56	97,12	69,9	90,43	84,7
11E4.088	3,72	312,9	3,98	96,02	97,26	69,3	95,17	95,14
11E4.089	2,00	325,7	2,45	97,55	97,26	71,1	88,76	87,54
11E4.090	2,31	360,0	4,92	95,08	97,25	67	86,83	84,97
11E4.091	2,29	372,9	6	94	97,19	69,7	90,01	88,21
11E4.093	2,56	325,7	8,21	91,79	96,98	68,5	89,76	85,43
11E4.094	2,63	338,6	6,15	93,85	97,56	70,8	88,19	85,58
11E4.095	1,69	381,4	4,05	95,95	97,29	70,7	89,93	90,26
11E4.096	2,30	407,1	4,74	95,26	97,00	68,5	91,3	89,09
11E4.097	2,69	351,4	8,55	91,45	97,02	68,5	89,23	84,18
11E4.098	2,61	351,4	4,24	95,76	97,11	72,2	88,77	88,92
11E4.099	2,93	398,6	3,49	96,51	97,29	69	87,15	86,2
11E4.100	2,95	342,9	4,87	95,13	97,33	66	86,67	88,17
11E4.102	3,20	377,1	4,98	95,02	97,30	64,7	88,99	88,67
11E4.103	2,97	355,7	4,96	95,04	97,25	68,3	90,24	89,22
11E4.104	2,39	364,3	5,52	94,48	97,40	72	86,9	85,32
11E4.105	3,54	415,7	4,68	95,32	97,16	74,3	89,78	89,99
11E4.106	2,31	381,4	5,48	94,52	97,08	71,1	90,6	87,69
11E4.107	1,93	351,4	6,75	93,25	97,07	66,7	90,86	88,39
11E4.110	2,95	402,9	7,08	92,92	97,49	70,2	90,45	86,52
11E4.111	2,93	342,9	5,7	94,3	97,39	72,2	89,39	84,78
11E4.112	7,14	450,0	3,99	96,01	96,89	73,7	92,6	90,43
11E4.114	3,84	360,0	8,96	91,04	97,04	70,8	89,15	86,44
11E4.115	3,46	355,7	9,73	90,27	96,83	68,7	86,41	82,07
11E4.116	2,90	390,0	6,98	93,02	97,03	72,9	90,97	89,4
11E4.117	2,89	390,0	4,79	95,21	97,15	72	91,54	89,55
11E4.118	3,52	347,1	7,93	92,07	96,94	68,9	86,78	85,92
11E4.119	4,84	402,9	3,06	96,94	97,09	74,5	95,33	96,38

ФИГУРА 18 (продолжение)

11E4.121	3,74	372,9	4,26	95,74	97,04	73,7	95,48	93,24
11E4.127	6,28	385,7	3,57	96,43	97,29	72,6	95,6	96,29
31B3_S_CONS.147	6,40	325,7	0,37	99,63	98,04	71,4	98,58	97,1
31B3_S_CONS.158	9,88	304,3	0,34	99,66	97,76	71,7	98,37	96,02
29E10_CONS.001	3,12	325,7	1,51	96,39	98,58	63,8	96,58	94,03
29E10_CONS.002	2,74	342,9	1,57	96,38	98,65	64,9	96,73	94,31
29E10_CONS.003	2,58	282,9	1,92	98,08	98,87	66	96,1	93,51
29E10_CONS.004	2,91	274,3	1,44	98,56	99,37	64,4	96,48	93,98
29E10_CONS.005	3,40	355,7	1,14	98,86	99,35	63,1	97,36	94,96
29E10_CONS.006	2,30	317,1	1,27	98,73	99,40	64,2	97,07	94,64
29E10_CONS.007	2,06	282,9	0,92	99,08	99,37	64,1	97,4	94,9
29E10_CONS.008	1,80	347,1	1,16	98,84	98,82	66,5	97,14	94,6
29E10_CONS.009	3,05	12,9	0	0	0,00			
23E10_CONS.011	2,63	291,4	1,31	96,04	99,45	64,4	96,45	93,77
29E10_CONS.012	3,19	342,9	1,91	95,35	98,50	64,8	95,54	93,28
29E10_CONS.013	5,43	308,6	3,61	93,82	98,88	64,5	93,83	92,21
29E10_CONS.014	3,32	338,6	3,72	93,68	98,73	65,8	93,67	92,58
29E10_CONS.015	3,30	308,6	2,67	94,8	93,27	67,9	95,02	93,16
29E10_CONS.016	2,88	304,3	1,44	95,9	98,60	67,2	96,54	93,95
29E10_CONS.017	2,88	407,1	1,36	96,33	98,88	64,7	96,66	94,04
29E10_CONS.018	2,30	407,1	1,33	96,35	98,80	64,2	96,75	94,11
29E10_CONS.019	1,95	437,1	1,34	96,41	98,94	65,6	96,77	94,13
29E10_CONS.020	2,04	338,6	3,55	94,06	99,42	65,3	93,94	92,43
29E10_CONS.021	2,34	355,7	4,09	93,58	99,40	55,9	94,06	92,49
29E10_CONS.022	2,78	300,0	4,33	93,21	99,39	61,4	93,15	91,53
29E10_CONS.023	2,90	291,4	3	94,64	99,28	55,1	95,07	92,63
29E10_CONS.024	1,49	300,0	3,89	93,55	99,34	66	93,75	92,33
29E10_CONS.025	2,86	295,7	3,28	94,21	98,50	66,9	94,43	92,66
29E10_CONS.026	3,12	304,3	3,44	94,23	98,80	66	93,87	92,96
29E10_CONS.027	2,77	338,6	1,06	96,49	98,67	66,6	96,86	94,19
29E10_CONS.028	2,92	274,3	2,31	94,2	99,95	65,3	95,33	93,4
29E10_CONS.029	2,72	287,1	2,3	94,14	99,61	66	95,55	93,82
29E10_CONS.030	2,97	325,7	2,2	95,53	99,39	64,9	96,04	93,47
29E10_CONS.031	2,01	334,3	2,46	95,37	99,41	49,7	95,74	94,14
29E10_CONS.032	2,22	261,4	2,02	96,19	99,46	65,3	96,38	93,73
29E10_CONS.033	2,52	300,0	1,59	96,52	99,59		96,47	93,97
29E10_CONS.034	3,04	287,1	0,9	97,32	99,34		97,47	95,01
29E10_CONS.035	2,52	304,3	2,83	95,5	99,36	65,1	95,06	93
29E10_CONS.036	3,06	287,1	3,04	95,15	99,42	66,1	94,89	92,95
29E10_CONS.038	4,66	342,9	2,85	95,18	99,36	66,1	95,53	93,58
29E10_CONS.039	9,52	291,4	3,83	94,15	99,45	65,1	94,46	92,3
29E10_CONS.040	8,31	287,1	3,04	95,28	99,42	63,9	95,35	93,05
29E10_CONS.042	2,19	304,3	3,11	95,13	98,72	65,9	95,03	93,07

ФИГУРА 18 (продолжение)

29E10_CONS.043	1,99	278,6	2,6	95,59	99,38	63	95,89	93,69
29E10_CONS.044	2,91	317,1	2,33	95,97	99,29	62,2	96,09	93,83
29E10_CONS.045	2,33	347,1	2,73	95,4	98,83	62,6	95,85	93,85
29E10_CONS.046	3,24	291,4	2,12	96,22	99,48	64,8	96,5	93,94
29E10_CONS.047	2,97	274,3	2,11	96,47	99,32	66,4	96,33	94,07
29E10_CONS.048	3,46	287,1	1	96,99	99,30	64,4	97,58	94,94
29E10_CONS.049	3,49	321,4	2,52	95,52	99,33	61,5	95,67	93,86
29E10_CONS.050	3,28	265,7	4,18	93,31	99,75	67,7	92,93	91,42
29E10_CONS.051	3,34	282,9	2,93	95,56	99,15	66,3	93,21	92,83
29E10_CONS.052	3,35	270,0	3,75	94,37	99,27	65,4	93,71	92,35
29E10_CONS.053	3,36	321,4	3,68	87,67	99,40	67,3	88,61	86,42
29E10_CONS.054	2,60	282,9	4,26	93,81	99,78	65,2	93,4	93,17
29E10_CONS.055	2,29	240,0	4,56	90,82	99,91	67,4	90,73	88,91
29E10_CONS.056	2,63	342,9	3,27	85,79	99,91	64,8	88,33	86,29
29E10_CONS.057	3,69	304,3	3,62	93,11	99,87	64,1	92,95	92,25
29E10_CONS.058	3,02	338,6	3,54	88,27	99,92	64,3	99,73	87,77
29E10_CONS.059	2,94	295,7	3,91	93,14	99,84	66,7	92,72	91,7

* использовали в качестве контроля

ФИГУРА 18 (продолжение)

Таблица 5. Конструирование дрожжевого дисплея CD112R 2

Наименование	Значение EC50, определенное посредством RGA CD112R с клетками			
	Jurkat (нМ)	пре-MP SEC (%)	MP SEC (%)	MP MCE NR (%)
1E1.016*	0,26	6,4	88,36	99,09
1E1.016.002	0,85	7,9	86,7	98,48
1E1.016.004	0,38	nd	nd	98,51
1E1.016.005	0,30	7,4	85,69	98,85
1E1.016.007	0,37	9,2	83,9	98,79
1E1.016.008	0,26	8,4	83,59	98,74
1E1.016.003	2,56	nd	nd	97,67
1E1.016.010	1,06	8	87,15	98,78
1E1.016.012	0,39	1	97,15	99,06
1E1.016.013	0,34	7,7	85,7	98,83
1E1.016.014	0,37	nd	nd	98,84
1E1.016.015	0,44	9,1	84,56	99,01
1E1.016.016	0,30	8,3	84,3	98,95
1E1.016.018	0,47	8,6	84,96	98,71
1E1.016.020	0,50	nd	nd	96,45
1E1.016.021	0,30	7,8	85,31	98,96
1E1.016.023	0,38	8,6	84,03	98,33
1E1.016.024	0,26	8,3	83,93	98,95
1E1.016.025	0,64	0,8	96,95	98,21
1E1.016.026	0,48	7,2	86,29	98,66
1E1.016.027	0,41	nd	nd	97,59
1E1.016.028	0,32	0,7	97,8	98,56
1E1.016.029	0,31	7,4	85,66	98,85
1E1.016.030	0,28	1,1	96,91	98,28
1E1.016.031	0,31	7	85,33	99,03
1E1.016.032	0,25	7,9	84,47	98,88
1E1.016.033	3,06	0,7	97,7	99,59
1E1.016.034	1,20	7,1	86,53	98,68
1E1.016.035	0,48	0,8	98,77	99,56
1E1.016.036	0,44	0,7	97,31	99,66
1E1.016.037	0,34	7,2	86,33	98,95
1E1.016.038	0,33	0,9	97,67	99,70
1E1.016.039	0,52	7,8	85,42	93,08
1E1.016.040	0,27	7,9	85,02	99,01
1E1.016.041	2,11	0,6	98,98	99,55
1E1.016.042	1,23	6,1	89,2	99,21
1E1.016.043	0,41	0,6	99,42	98,65
1E1.016.044	0,40	0,7	98,01	99,74
1E1.016.045	0,33	6,3	88,43	96,14
1E1.016.046	0,32	0,7	98,01	99,96

ФИГУРА 18 (продолжение)

1E1.016.047	0,46	6,5	88,63	99,37
1E1.016.048	0,27	7,1	87,21	99,19
1E1.016.049	0,53	0,6	97,79	99,80
1E1.016.050	0,46	6,2	88,71	99,16
1E1.016.051	0,31	0,6	98,96	99,74
1E1.016.052	0,32	0,6	98,11	99,77
1E1.016.053	0,29	6,4	87,86	99,27
1E1.016.054	0,27	0,9	97,79	99,69
1E1.016.055	0,36	6,7	87,77	99,15
1E1.016.056	0,27	6,7	87,39	99,15
1E1.016.057	0,42	0,7	98,78	85,31
1E1.016.058	0,39	7,8	86,44	96,08
1E1.016.059	0,31	0,7	99,32	99,60
1E1.016.060	0,29	0,6	98,05	99,43
1E1.016.061	0,29	7,8	85,78	99,06
1E1.016.062	0,29	0,8	97,82	99,49
1E1.016.063	0,31	8,1	85,72	99,25
1E1.016.064	0,29	8,4	85,04	99,14
1E1.016.065	2,77	0,6	93,97	99,91
1E1.016.066	1,42	6,7	87,33	98,97
1E1.016.067	0,53	0,6	93,87	99,53
1E1.016.068	0,50	0,6	98,12	99,81
1E1.016.069	0,38	7,1	86,83	99,14
1E1.016.070	0,35	0,6	97,92	99,69
1E1.016.071	0,50	6,4	87,57	99,30
1E1.016.072	0,34	7,3	86,42	99,17
1E1.016.073	0,61	0,6	98,14	99,61
1E1.016.074	0,55	5,5	90,13	99,40
1E1.016.075	0,37	0,6	99,02	99,55
1E1.016.075	0,37	0,6	98,27	99,80
1E1.016.077	0,32	6,3	88,69	99,25
1E1.016.078	0,33	0,7	98,1	99,83
1E1.016.079	0,38	5,7	90,09	99,95
1E1.016.080	0,32	6,7	88,13	99,87
1E1.016.081	0,00	nd	nd	99,45
1E1.016.082	3,95	7,4	85,73	98,87
1E1.016.083	0,00	nd	nd	0,00
1E1.016.084	0,96	0,9	98,38	99,10
1E1.016.085	0,47	7,4	85,89	99,09
1E1.016.086	0,00	nd	nd	0,00
1E1.016.087	0,81	7,5	84,5	99,07
1E1.016.088	0,35	7,8	84,81	98,98
1E1.016.089	0,44	0,6	98,03	99,72

ФИГУРА 18 (продолжение)

1E1.016.090	0,44	5,3	90,88	99,59
1E1.016.091	0,34	0,6	98,07	99,63
1E1.016.092	0,32	0,7	98,11	99,94
1E1.016.093	0,35	6,2	89,2	99,46
1E1.016.094	0,32	0,9	97,83	99,92
1E1.016.095	0,35	5,7	90,64	99,77
1E1.016.096	0,25	6,7	88,92	94,95
1E1.016.097	2,28	0,8	97,95	98,76
1E1.016.098	1,41	5,3	91,17	95,57
1E1.016.099	0,55	0,9	97,47	98,59
1E1.016.100	0,40	0,6	98,07	98,62
1E1.016.101	0,31	5,6	90,33	94,75
1E1.016.102	0,31	0,8	98,02	98,87
1E1.016.103	0,45	5,7	90,85	95,00
1E1.016.104	0,30	7,1	88,61	94,19
1E1.016.105	2,64	0,6	98,06	98,74
1E1.016.106	1,61	6,2	88,28	93,22
1E1.016.107	0,50	1,2	96,7	98,23
1E1.016.108	0,48	0,8	97,78	98,28
1E1.016.109	0,32	6,6	87,32	93,49
1E1.016.110	0,33	0,7	93,01	98,69
1E1.016.111	0,51	6,8	87,42	92,87
1E1.016.112	0,32	7,5	86,68	93,20
1E1.016.113	2,13	0,7	97,95	98,56
1E1.016.114	1,05	6,7	87,79	92,85
1E1.016.115	0,54	1,1	97,07	98,56
1E1.016.116	0,56	0,9	97,61	98,58
1E1.016.117	0,33	6,6	88,1	92,78
1E1.016.118	0,40	0,7	97,95	96,12
1E1.016.119	0,66	7	87,13	92,18
1E1.016.120	0,27	7,8	86,25	91,34
1E1.016.121	2,32	0,8	97,99	98,85
1E1.016.122	1,16	5,5	91,24	93,12
1E1.016.123	0,43	0,9	97,62	99,25
1E1.016.124	0,42	0,9	97,69	98,83
1E1.016.125	0,23	5,5	90,86	87,51
1E1.016.126	0,28	0,9	97,94	99,42
1E1.016.127	0,44	5,4	91,5	97,14
1E1.016.128	0,31	1	97,13	99,02
1E1.016.129	0,30	1	97,75	97,35
1E1.016.130	0,34	0,8	97,51	98,85
1E1.016.131	0,34	0,5	97,05	98,02
1E1.016.132	0,29	6,9	88,32	94,44

ФИГУРА 18 (продолжение)

1E1.016.139	0,47	0,8	97,54	95,45
1E1.016.140	0,96	nd	nd	97,38
1E1.016.141	0,47	1,5	96,92	99,23
1E1.016.142	1,78	0,7	97,83	99,03
1E1.016.148	0,84	0,7	97,4	98,78
1E1.016.149	0,39	0,7	98,08	98,85
1E1.016.150	0,31	0,7	97,92	98,84
1E1.016.151	0,32	1,1	97,78	98,50
1E1.016.152	0,70	0,8	97,98	98,87
1E1.016.153	0,98	0,6	97,98	98,62
1E1.016.154	0,40	0,6	98,09	98,82
1E1.016.155	0,41	0,7	97,64	98,50
1E1.016.156	0,28	1,3	97,52	98,76
1E1.016.157	0,50	0,7	97,96	98,83
1E1.016.158	0,94	1,3	97,5	98,75
1E1.016.159	0,42	11,1	80,86	91,35

* использовали в качестве контроля.

ФИГУРА 18 (продолжение)

Таблица 12. Конструирование TIGIT с определением горячих точек

Наименование	Выделение (мг/л)	пре-MP SEC (%)	Tagg (°C)	Средн. интерполированное значение EC50, определенное посредством RGA с клетками Jurkat (мкг/мл) (n = 2)
4G10	348	4	65	0,39
11A3	223	1	70	0,14
28B8	140	9	76	0,38
39D2	224	12	64	0,19
43B7	173	10	67	0,17
55G7	17	25	nd	3,18
66H9	161	2	67	0,22
43B7.002	245	12	69	0,15
58A7.002	171	7	73	0,52
58A7.003	183	6	65	0,73
66H9.004	132	2	70	0,75
66H9.005	165	3	66	0,67
66H9.006	121	2	69	0,50
66H9.007	141	2	68	0,27
66H9.008	106	2	68	0,28
66H9.009	152	2	67	0,19
66H9.010	155	2	69	0,23
58A7.002.004	193	9	69	0,65
58A7.002.005	207	12	70	0,80
58A7.002.006	218	9	70	0,91
58A7.002.008	259	12	66	1,46
58A7.002.009	217	11	67	0,66
58A7.003.001	187	6	69	9,90
58A7.003.002	161	12	74	7,04
58A7.003.004	185	8	71	0,65
58A7.003.005	165	10	67	0,41
58A7.003.006	150	9	71	0,49
58A7.003.008	191	11	70	0,39
58A7.003.009	171	10	71	0,87
58A7.003.016	173	16	69	8,60
58A7.003.019	151	15	69	4,59
55G7.004	8	29	nd	2,48
55G7.005	18	28	nd	1,21
55G7.006	19	31	nd	2,59
55G7.037	9	49	69	1,44
55G7.038	12	30	69	2,82
55G7.041	27	31	nd	1,37

ФИГУРА 18 (продолжение)

55G7.042	29	11	nd	2,87
55G7.043	23	19	nd	4,83
28B8.003	148	7	74	0,32
28B8.004	150	10	73	0,33
28B8.005	153	8	69	0,29
28B8.006	112	10	76	0,26
28B8.007	131	7	77	0,31
28B8.008	128	11	71	0,34
28B8.009	122	9	78	0,33
43B7.002.001	193	8	66	0,25
43B7.002.002	240	14	64	0,24
43B7.002.003	252	14	69	0,37
43B7.002.004	240	11	69	0,22
43B7.002.005	229	11	70	0,23
43B7.002.006	199	9	72	0,16
43B7.002.007	219	9	72	0,27
43B7.002.008	201	7	72	0,11
43B7.002.009	223	18	70	0,21
43B7.002.010	227	16	70	0,23
43B7.002.011	274	13	69	0,21
43B7.002.012	250	13	69	0,15
43B7.002.013	199	12	68	0,31
43B7.002.014	211	11	68	0,21
43B7.002.015	217	7	71	0,17
43B7.002.016	212	9	72	0,21
43B7.002.017	261	17	68	0,23
43B7.002.018	281	16	69	0,28
43B7.002.019	206	12	70	0,28
43B7.002.020	207	11	71	0,17
39D2.003	209	12	66	0,39
39D2.004	225	11	65	0,17
39D2.006	206	11	65	0,22
39D2.011	183	10	66	0,25
39D2.013	203	9	65	0,15
39D2.014	174	12	66	0,31
39D2.015	192	12	86	0,28
39D2.016	223	10	66	0,24
39D2.018	178	9	68	0,20
39D2.020	129	10	67	0,37
39D2.022	138	9	62	0,23
39D2.024	191	11	57	0,19
39D2.025	182	10	54	0,17
39D2.027	101	9	58	0,15

ФИГУРА 18 (продолжение)

39D2.028	209	11	60	0,21
39D2.030	187	9	66	0,15
39D2.031	153	14	68	0,17
39D2.032	173	11	69	0,17
39D2.034	188	0	69	0,21
39D2.037	166	19	67	0,26
39D2.038	153	20	68	0,26
39D2.039	223	16	70	0,22
39D2.040	176	19	65	0,19
4G10.003	498	4	64	0,33
4G10.004	493	5	66	0,55
4G10.005	455	5	67	0,61
4G10.006	379	6	68	0,75
4G10.007	336	5	66	0,85
4G10.008	357	5	66	0,73
4G10.009	327	6	69	0,38
4G10.010	370	7	69	0,90
4G10.011	341	5	68	0,39
4G10.012	345	5	68	0,98
4G10.013	426	6	70	0,51
4G10.014	423	6	67	1,03
4G10.015	394	5	67	0,69
4G10.016	368	5	70	1,51
4G10.017	357	6	71	1,51
4G10.018	346	7	67	2,57
4G10.019	298	6	66	2,07
4G10.020	328	8	66	1,77
4G10.021	321	7	69	1,76
4G10.022	367	6	73	2,95
4G10.023	370	6	72	1,22
4G10.024	375	6	71	0,99
4G10.025	404	5	72	1,10
4G10.026	366	6	72	2,03
4G10.027	390	5	55	2,01
11A3.003	221	1	66	0,12
11A3.004	172	2	64	0,11
11A3.005	221	1	69	0,09
11A3.006	242	2	76	4,17
11A3.007	60	3	73	2,11
11A3.009	97	2	75	0,14
11A3.010	169	1	71	0,11
11A3.011	225	2	68	9,85
11A3.012	192	3	68	3,56

ФИГУРА 18 (продолжение)

11A3.015	202	3	67	2,16
11A3.018	223	2	69	4,28
11A3.021	180	2	72	2,84
11A3.024	218	2	66	2,76

ФИГУРА 18 (продолжение)

Таблица 13. Конструирование каркаса TIGIT (мишень Fv 1 = TIGIT человека)

Наименование	Среднее значение EC50, определенное посредством RGA с клетками Jurkat, нМ	Титр (мг/л)	Выделение (мг/л)	пре- MP SEC (%)	MP MCE NR (%)	Tm1	MP SRC, 2wk40C	Δ% MP SEC, 2wk40C
55G7.041*	4,49	692	477	7,2	95,8	66,8	97,6	1,7
55G7.041.001	6,61	756	486	5,2	97,0	66,5	97,1	-0,2
55G7.041.002	7,04	753	545	4,3	96,7	65,2	98,0	0,4
55G7.041.004	6,70	774	548	3,6	97,5	70,2	97,6	-0,8
55G7.041.006	4,91	762	548	4,8	97,1	66,6	98,5	0,7
55G7.041.008	5,92	764	522	3,4	97,5	68,8	97,9	-0,7
55G7.041.010	4,58	695	516	3,2	97,3	68,8	97,5	-0,6
43B7.002*	3,44	396	305	2,2	97,4	76,9	98,2	-0,8
43B7.002.015.006	3,90	485	337	1,9	92,5	75,2	98,5	-1,0
43B7.002.015.008	6,59	644	373	6,2	94,2	71,6	98,8	0,6
43B7.002.015.009	3,30	483	341	0,7	97,0	72,0	98,8	-0,8
43B7.082.015.010	3,02	511	392	2,1	96,3	72,5	96,7	-2,1
43B7.002.015.012	3,30	519	289	1,9	98,5	70,9	98,7	-0,5
43B7.002.015.014	4,72	574	350	2,5	97,2	70,7	98,0	-0,8
43B7.002.015.017	7,46	439	256	8,3	98,1	70,2	98,8	2,2
66H9*	6,38	511	363	4,6	96,0	80,5	98,8	0,1
66H9.009*	6,00	509	341	4,7	95,7	71,9	98,0	-0,5
66H9.011	5,62	468	311	0,6	99,1	72,8	99,4	-0,5
66H9.012	4,88	595	405	3,2	97,9	73,4	96,3	-2,6
66H9.017	9,22	463	331	0,8	98,3	73,7	99,3	-0,5

* использовали в качестве контроля

ФИГУРА 18 (продолжение)

Таблица 14. Конструирование дрожжевого дисплея TIGIT 1

Наименование	Средн. знач. EC50 (нМ) перехода, определенное посредством RGA с клетками Jurkat	Средн. знач. максимальной активности, измеренное посредством RGA с клетками Jurkat	Выделен не (мг/л)	пре-MP SEC (%)	MP MCE NR (%)
43B7.002.015*	1,28	5,39	176	2,1	99,1
43B7.002.015.006	1,60	4,62	234	5,3	98,4
43B7.002.015.008	1,24	5,16	242	0,8	99,5
43B7.002.015.002	2,21	5,39	267	4,5	98,3
43B7.002.015.014	0,91	4,62	274	0,9	96,9
43B7.002.015.AM001	0,60	4,61	197	6,4	99,2
43B7.002.015.AM002	0,70	5,26	200	4,2	99,2
43B7.002.015.AM003	0,79	6,12	200	2,7	99,0
43B7.002.015.AM022	0,64	4,70	218	9,2	98,7
43B7.002.015.AM005	1,11	6,40	224	4,8	98,8
43B7.002.015.AM006	1,29	4,94	175	6,8	98,8
43B7.002.015.AM007	1,04	5,18	204	5,8	99,0
43B7.002.015.AM008	1,05	4,94	140	4,9	98,9
43B7.002.015.AM009	1,04	5,81	226	4,4	99,0
43B7.002.015.AM010	0,66	5,48	215	7,3	98,7
43B7.002.015.AM011	0,82	6,19	226	4,1	99,0
43B7.002.015.AM012	1,45	6,51	205	4,4	98,8
43B7.002.015.AM013	1,22	6,68	182	5,5	98,9
43B7.002.015.AM108	0,67	4,81	215	11,5	99,0
43B7.002.015.AM015	0,74	5,61	217	7,6	98,9
43B7.002.015.AM104	0,68	5,61	243	21,1	99,1
43B7.002.015.AM017	0,70	5,23	221	5,4	99,0
43B7.002.015.AM018	0,62	5,61	200	3,0	99,0
43B7.002.015.AM019	0,84	5,73	205	8,2	98,7
43B7.002.015.AM016	0,74	4,66	200	6,3	98,9
43B7.002.015.AM021	1,43	6,35	187	11,0	98,1
43B7.002.015.AM092	0,75	4,79	159	14,3	99,0
43B7.002.015.AM023	1,34	4,95	188	6,7	98,8
43B7.002.015.AM024	0,85	4,84	184	5,3	98,8
43B7.002.015.AM025	1,01	5,17	204	10,9	98,7
43B7.002.015.AM026	0,92	6,10	192	7,0	99,3
43B7.002.015.AM027	1,28	5,63	190	3,9	95,9
43B7.002.015.AM096	0,78	6,27	209	15,3	98,6
43B7.002.015.AM029	1,07	6,18	206	9,8	99,0
43B7.002.015.AM030	1,18	5,34	182	11,1	99,0
43B7.002.015.014.AM008	0,78	5,92	178	0,7	99,4
43B7.002.015.AM032	0,66	4,95	153	7,7	98,9
43B7.002.015.AM033	0,68	4,87	199	7,3	99,3
43B7.002.015.AM034	1,40	6,78	231	11,4	98,6

ФИГУРА 18 (продолжение)

43B7.002.015.AM035	0,82	5,73	203	5,3	98,8
43B7.002.015.AM091	0,84	5,10	225	18,7	99,4
43B7.002.015.AM037	1,22	5,97	100	2,2	99,4
43B7.002.015.AM038	1,26	5,36	206	6,8	98,9
43B7.002.015.AM039	1,07	4,33	205	4,8	98,8
43B7.002.015.AM040	1,80	5,20	192	7,3	98,8
43B7.002.015.AM041	1,23	4,38	176	4,6	98,9
43B7.002.015.AM042	0,69	5,37	161	5,0	98,8
43B7.002.015.AM043	0,96	5,63	201	4,3	99,0
43B7.002.015.AM044	1,59	6,32	212	5,8	98,8
43B7.002.015.AM045	1,07	6,03	181	12,8	98,9
43B7.002.015.AM046	1,19	5,62	138	13,1	98,8
43B7.002.015.AM047	1,81	5,06	192	12,8	99,1
43B7.002.015.AM048	1,25	5,56	169	11,6	99,2
43B7.002.015.AM049	0,62	4,84	200	11,2	99,0
43B7.002.015.AM050	0,78	5,70	162	12,9	99,5
43B7.002.015.AM051	1,18	5,98	203	14,6	99,5
43B7.002.015.AM052	0,83	6,29	123	6,3	99,0
43B7.002.015.AM053	0,87	5,76	188	12,2	98,2
43B7.002.015.AM054	1,31	5,35	221	14,7	98,8
43B7.002.015.AM055	0,75	4,63	186	16,3	98,5
43B7.002.015.AM056	1,55	6,27	198	11,8	98,2
43B7.002.015.AM057	1,06	5,30	206	12,8	98,7
43B7.002.015.AM058	1,05	6,53	203	12,8	98,8
43B7.002.015.AM059	1,09	6,31	219	13,3	98,7
43B7.002.015.AM060	1,05	5,69	187	13,3	98,2
43B7.002.015.AM061	1,59	7,42	224	15,1	98,8
43B7.002.015.AM062	0,94	6,05	146	9,9	98,7
43B7.002.015.AM063	1,49	5,86	215	12,5	98,9
43B7.002.015.AM064	1,22	5,78	240	16,6	97,4
43B7.002.015.AM065	0,97	5,52	139	18,5	98,9
43B7.002.015.AM066	1,36	6,80	213	11,8	99,2
43B7.002.015.AM067	1,04	6,11	198	12,3	99,4
43B7.002.015.AM068	1,14	6,27	196	11,5	99,6
43B7.002.015.AM069	1,05	6,13	212	14,3	98,9
43B7.002.015.AM070	0,84	5,24	175	16,7	99,6
43B7.002.015.AM071	1,24	5,24	209	16,0	99,6
43B7.002.015.AM072	0,51	5,01	155	8,5	98,8
43B7.002.015.AM073	1,45	7,02	217	11,0	99,2
43B7.002.015.AM074	1,15	6,11	241	18,6	98,9
43B7.002.015.AM075	1,26	5,51	219	15,1	99,1
43B7.002.015.014.AM002	0,86	6,73	299	1,9	98,5
43B7.002.015.AM077	1,37	5,51	176	14,2	98,2

ФИГУРА 18 (продолжение)

43B7.002.015.AM078	0,57	4,74	179	13,0	98,9
43B7.002.015.AM079	0,86	5,07	197	15,2	99,4
43B7.002.015.AM080	1,17	5,32	168	13,8	98,8
43B7.002.015.AM081	1,19	5,74	194	15,9	99,6
43B7.002.015.AM082	0,89	6,67	135	11,2	99,7
43B7.002.015.AM102	0,87	5,82	148	13,8	99,1
43B7.002.015.AM084	1,76	6,34	223	14,1	99,6
43B7.002.015.AM083	0,88	7,82	193	15,0	99,4
43B7.002.015.014.AM010	0,88	5,03	296	1,2	88,8
43B7.002.015.AM087	1,45	5,02	190	15,5	99,0
43B7.002.015.AM014	0,90	5,05	199	4,7	99,3
43B7.002.015.AM089	1,29	4,96	229	19,5	98,6
43B7.002.015.AM090	1,35	5,60	203	18,2	99,1
43B7.002.015.AM036	0,91	5,72	185	4,2	98,9
43B7.002.015.AM020	0,92	6,23	191	4,9	98,7
43B7.002.015.AM098	0,92	4,79	222	18,6	98,5
43B7.002.015.AM094	1,61	6,16	252	18,9	98,1
43B7.002.015.AM095	1,30	4,59	229	18,8	98,3
43B7.002.015.AM086	0,93	5,80	202	15,6	99,3
43B7.002.015.AM076	0,93	5,96	196	14,1	98,8
43B7.002.015.AM093	0,94	6,08	222	16,5	98,5
43B7.002.015.AM099	1,11	5,39	229	19,5	99,0
43B7.002.015.AM100	1,78	5,87	223	20,3	98,5
43B7.002.015.AM101	1,13	6,63	224	20,0	98,1
43B7.002.015.AM004	0,95	5,55	219	5,8	98,8
43B7.002.015.AM103	1,32	5,17	227	14,3	99,1
43B7.002.015.AM118	0,96	5,16	239	13,3	99,2
43B7.002.015.AM105	1,67	5,17	201	12,9	99,4
43B7.002.015.AM028	0,97	5,83	185	8,1	98,7
43B7.002.015.AM107	1,47	5,30	176	10,8	98,7
43B7.002.015.AM031	0,98	5,11	226	10,1	98,7
43B7.002.015.AM109	0,98	6,08	205	13,1	99,0
43B7.002.015.AM110	1,51	5,44	171	11,2	98,5
43B7.002.015.AM111	1,41	6,31	197	12,9	98,7
43B7.002.015.AM112	1,22	7,32	129	10,5	98,2
43B7.002.015.AM113	1,19	4,93	197	18,0	98,7
43B7.002.015.AM114	1,30	4,60	219	13,0	98,9
43B7.002.015.AM115	1,21	4,93	227	17,2	99,4
43B7.002.015.AM116	1,16	5,12	214	12,1	98,9
43B7.002.015.AM117	1,38	5,69	193	8,8	98,8
43B7.002.015.AM085	0,98	5,25	207	18,2	98,8
43B7.002.015.AM119	1,24	5,56	222	15,4	98,5
43B7.002.015.AM120	0,96	6,95	208	17,9	94,8

ФИГУРА 18 (продолжение)

43B7.002.015.AM121	3,43	3,63	218	14,0	96,2
43B7.002.015.AM122	0,66	5,01	175	11,0	97,1
43B7.002.015.AM123	1,13	5,19	198	10,4	91,9
43B7.002.015.AM124	1,25	5,37	251	18,3	97,4
43B7.002.015.AM125	1,47	5,99	222	17,9	96,3
43B7.002.015.AM126	1,39	5,55	212	9,7	93,9
43B7.002.015.AM127	1,79	4,71	179	7,6	96,5
43B7.002.015.AM128	1,46	6,75	233	13,8	95,5
43B7.002.015.AM129	1,37	5,50	243	16,1	96,4
43B7.002.015.AM130	1,07	4,98	198	18,6	96,4
43B7.002.015.AM131	1,37	5,56	208	14,4	96,5
43B7.002.015.AM132	1,17	5,31	175	11,6	99,4
43B7.002.015.AM133	1,23	6,12	222	11,7	98,9
43B7.002.015.AM134	1,45	4,91	243	17,6	99,1
43B7.002.015.AM135	1,26	5,07	200	18,4	99,5
43B7.002.015.AM136	1,18	6,18	218	20,0	99,2
43B7.002.015.AM137	1,46	4,62	210	28,5	99,4
43B7.002.015.AM138	1,22	6,07	203	16,0	96,1
43B7.002.015.AM139	1,81	5,33	208	18,3	96,8
43B7.002.015.AM140	1,84	5,39	202	16,6	96,8
43B7.002.015.AM141	1,38	6,36	224	18,0	95,9
43B7.002.015.AM142	0,76	5,07	143	16,5	96,1
43B7.002.015.AM143	1,31	5,89	208	19,8	96,7
43B7.002.015.AM144	1,36	6,79	216	19,8	95,8
43B7.002.015.002.AM001	2,77	5,16	243	10,5	89,9
43B7.002.015.002.AM002	1,71	4,89	258	9,3	99,0
43B7.002.015.002.AM003	1,95	4,86	256	9,3	87,8
43B7.002.015.002.AM004	2,06	5,09	254	8,4	92,6
43B7.002.015.002.AM005	1,83	5,48	250	11,2	99,0
43B7.002.015.002.AM006	2,43	5,50	231	8,9	99,0
43B7.002.015.002.AM007	4,12	5,46	221	9,2	89,1
43B7.002.015.002.AM008	1,49	6,59	192	7,9	98,7
43B7.002.013.002.AM009	2,67	5,42	221	10,9	98,8
43B7.002.015.002.AM010	2,57	4,61	255	10,5	99,2
43B7.002.015.006.AM001	1,26	5,17	307	2,1	98,9
43B7.002.015.006.AM002	1,78	6,66	272	0,9	98,5
43B7.002.015.006.AM003	1,08	6,27	290	1,9	96,1
43B7.002.015.006.AM004	1,40	5,89	292	1,4	95,8
43B7.002.015.006.AM005	1,39	5,39	307	2,4	97,1
43B7.002.015.006.AM006	1,29	7,03	274	2,6	99,6
43B7.002.015.006.AM007	1,53	4,97	259	2,3	95,8
43B7.002.015.006.AM008	0,60	5,32	201	0,6	89,5
43B7.002.015.006.AM009	0,92	5,05	266	0,8	98,8

ФИГУРА 18 (продолжение)

43B7.002.015.006.AM010	1,03	5,11	315	2,3	99,3
43B7.002.015.008.AM001	2,38	6,45	258	10,0	99,1
43B7.002.015.008.AM002	1,08	5,07	264	8,4	99,2
43B7.002.015.008.AM003	2,03	4,83	276	8,6	98,2
43B7.002.015.008.AM004	2,26	6,63	265	8,8	95,0
43B7.002.015.008.AM005	1,73	5,60	277	11,4	97,2
43B7.002.015.008.AM006	1,96	5,62	254	7,6	96,1
43B7.002.015.008.AM007	2,46	6,10	229	8,2	99,7
43B7.002.015.003.AM008	1,29	5,41	196	9,0	97,1
43B7.002.015.008.AM009	4,46	5,14	248	9,9	90,9
43B7.002.015.008.AM010	2,22	5,73	256	11,0	98,2
43B7.002.015.014.AM001	1,30	5,05	291	1,9	99,6
43B7.002.015.AM088	1,01	5,50	192	13,9	99,6
43B7.002.015.014.AM003	1,36	5,30	294	1,9	98,7
43B7.002.015.014.AM004	1,04	5,85	289	1,5	98,8
43B7.002.015.014.AM005	0,90	4,65	276	1,7	94,9
43B7.002.015.014.AM006	1,65	5,75	291	1,4	96,5
43B7.002.015.014.AM007	1,42	5,52	150	0,8	99,4
43B7.002.015.AM105	1,01	5,33	201	16,3	99,2
43B7.002.015.014.AM009	1,34	6,66	284	1,3	96,8
43B7.002.015.AM097	1,02	4,98	215	14,8	98,0

* использовали в качестве контроля.

ФИГУРА 18 (продолжение)

Таблица 15. Конструирование дрожжевого дисплея TIGIT 2

Наименование	Значение EC50, определенное посредством RGA TIGIT		пре-MP SEC		MP MCE NR
	с клетками Jurkat (нМ)	(%)	MP SEC (%)	(%)	
58A7.003.008*	3,53	6,14	93,86	97,71	
58A7.003.008.001	1,86	3,68	96,32	97,55	
58A7.003.008.002	3,07	7,55	92,45	91,05	
58A7.003.008.003	2,17	3,39	96,61	97,83	
58A7.003.008.005	1,99	16,07	79,1	97,72	
58A7.003.008.007	1,60	10,44	89,56	97,76	
58A7.003.008.008	1,55	12,22	87,56	97,06	
58A7.083.008.009	3,18	3,4	96,6	97,69	
58A7.003.008.010	2,71	3,85	96,15	96,94	
58A7.003.008.011	2,17	2,81	97,19	95,49	
58A7.003.008.012	3,97	5,55	94,45	97,41	
58A7.003.008.013	4,41	5,79	94,21	97,85	
58A7.003.008.014	2,80	3,48	96,52	97,90	
58A7.003.008.015	2,04	3,92	96,08	97,81	
58A7.003.008.016	3,98	0,38	99,62	97,93	
58A7.003.008.017	4,16	0,36	99,64	97,04	
58A7.003.008.018	1,67	4,04	95,45	95,77	
58A7.003.008.019	2,02	5,12	94,88	96,72	
58A7.003.008.020	3,23	4,97	95,03	96,34	
58A7.003.008.021	5,57	6,95	93,05	97,50	
58A7.003.008.022	3,29	3,51	95,93	98,28	
58A7.003.008.023	2,14	3,56	96,12	97,91	
58A7.003.008.024	2,31	4,24	95,43	97,58	
58A7.003.008.027	4,25	2,66	97,34	97,64	
58A7.003.008.034	2,34	1,13	98,87	97,33	
58A7.003.008.035	4,48	7,26	92,74	98,07	
58A7.003.008.038	7,42	1,88	98,12	98,17	
58A7.003.008.037	6,71	11,13	88,87	97,81	
58A7.003.008.038	7,77	7,32	92,68	97,73	
58A7.003.008.039	4,28	6,5	93,5	97,08	
58A7.003.008.040	8,23	6,2	93,8	97,62	
58A7.003.008.041	6,37	6,42	93,58	97,70	
58A7.003.008.042	3,83	6,98	93,02	98,25	
58A7.003.008.043	2,29	8,42	91,58	97,88	
53A7.003.008.044	3,44	7,71	92,29	98,18	
58A7.003.008.045	4,09	7,52	92,48	98,48	
58A7.003.008.046	1,64	0,6	99,4	98,20	
58A7.003.008.047	1,80	4,57	95	98,55	
58A7.003.008.048	7,11	8,57	90,96	97,81	
58A7.003.008.049	3,60	8,25	91,75	97,62	

ФИГУРА 18 (продолжение)

58A7.003.008.050	2,05	7,28	92,72	98,28
58A7.003.008.051	2,54	7,23	92,37	98,15
58A7.003.008.052	4,02	8,45	91,55	98,19
58A7.003.008.053	3,54	3,71	96,29	98,31
58A7.003.008.054	3,98	7,69	92,31	98,27
58A7.003.008.055	2,86	7,13	92,87	98,01
58A7.003.008.056	3,09	1,43	98,57	98,10
58A7.003.008.057	4,50	3,45	90,07	97,75
53A7.003.008.058	1,66	0,5	99,5	98,47
58A7.003.008.059	1,59	4,86	95,14	98,06
58A7.003.008.060	4,95	9,8	87,4	94,00
58A7.003.008.061	2,47	5,04	94,96	97,85
58A7.003.008.062	3,20	6,69	93,31	97,89
58A7.003.008.063	1,71	0,39	99,61	97,85
58A7.003.008.064	2,05	6,01	93,99	97,74
58A7.003.008.065	2,70	6,07	93,93	97,75
58A7.003.008.066	1,88	7,43	92,57	98,38
58A7.003.008.067	2,53	6,89	93,11	98,04
58A7.003.008.068	2,96	2,72	97,23	98,52
58A7.003.008.063	3,49	8,09	91,41	97,99
58A7.003.008.071	3,14	6,91	92,71	97,45
58A7.003.008.072	3,56	2,58	97,42	98,38
58A7.003.008.073	2,41	0,68	99,32	97,87
58A7.003.008.074	2,08	2,36	97,64	98,03
58A7.003.008.075	0,95	5,88	93,45	97,53
58A7.003.008.076	3,02	8,57	91,43	97,91
58A7.003.008.077	3,66	8,8	91,2	97,61
58A7.003.008.078	2,39	7,68	92,32	97,97
58A7.003.008.073	1,98	9,25	90,75	97,72
58A7.003.008.080	3,55	7,57	88,21	94,28
58A7.003.008.031	3,44	7,85	92,15	97,65
58A7.003.008.082	1,52	2,31	97,69	98,24
58A7.003.008.083	1,23	7,02	92,98	97,48
58A7.003.008.084	3,88	2,51	97,49	98,46
58A7.003.008.083	5,95	8,44	88,73	94,45
58A7.003.008.088	3,08	5,36	94,64	97,65
58A7.003.008.087	2,06	7,35	92,65	97,85
58A7.003.008.088	3,42	4,3	95,7	97,16
58A7.003.008.089	6,99	2,68	97,32	97,72
58A7.003.008.090	3,09	2,89	84,55	88,18
58A7.003.008.091	4,73	6,09	93,54	97,73
58A7.003.008.092	1,68	8,67	91,33	97,66
58A7.003.008.094	4,85	3,84	96,16	97,32

ФИГУРА 18 (продолжение)

58A7.003.008.096	8,51	14,92	85,08	98,80
58A7.003.008.098	7,08	11,49	88,01	97,44
58A7.003.008.099	7,97	13,24	83,35	93,84
58A7.003.008.100	9,92	13,83	85,86	93,90
58A7.003.008.103	6,96	7,66	91,81	97,17
58A7.003.008.104	6,97	7,07	92,41	96,82
58A7.003.008.106	9,07	14,18	85,82	96,15
58A7.003.008.110	5,59	7,6	92,4	97,45
58A7.003.008.111	2,56	7,31	92,11	97,29
58A7.003.008.113	3,37	5,1	94,9	97,71
58A7.003.008.134	5,86	1,59	98,41	97,56
58A7.003.008.136	4,73	9,78	90,22	94,33
58A7.003.008.138	4,94	8,34	91,66	97,51
58A7.003.008.139	5,14	9,34	88,38	93,66
58A7.003.008.140	4,71	8,75	91,25	97,49
58A7.003.008.141	5,47	8,24	91,76	97,38
58A7.003.008.142	9,81	13,67	86,33	97,21
58A7.003.008.143	3,42	5,23	94,77	97,05
58A7.003.008.144	3,79	5,56	94,44	96,85
58A7.003.008.143	2,15	6,12	93,88	96,24
58A7.003.008.146	5,80	24,1	75,9	97,15
58A7.003.008.147	6,00	7,32	92,68	96,50
58A7.003.008.148	4,55	22,44	77,56	97,07
58A7.003.008.150	6,20	4,27	95,73	97,24

* использовали в качестве контроля.

ФИГУРА 18 (продолжение)

Таблица 16. Определение характеристик связывания TIGIT человека

Наименование	BioReg№	k_a (1/мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	R_{max} (RU)
43B7.002.015	5310-3	3,81E+06	1,98E-04	5,19E-11	20,7
55G7.041	1325-4	1,82E+06	416E-04	2,28E-10	68,9
58A7.003.008	5311-4	1,94E+06	5,49E-04	2,83E-10	24,8
66H9.009	5312-3	2,07E+06	1,08E-04	5,23E-11	22,8

Таблица 17. Определение характеристик связывания TIGIT яванского макака

Наименование	BioReg№	K_D (М)	R_{max} (RU)
43B7.002.015	5310-3	1,30E-08	25,1
55G7.041	1325-4	2,50E-08	80,8
58A7.003.008	5311-4	9,39E-09	25,3
66H9.009	5312-3	3,47E-08	21,4

Таблица 18. Определение характеристик связывания CD112R человека

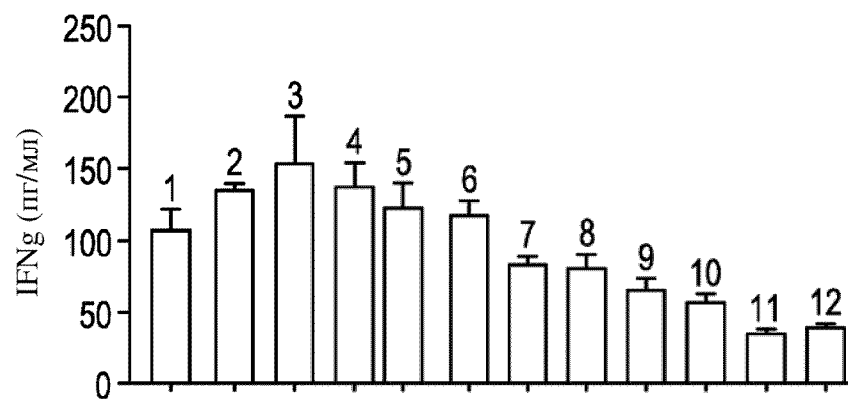
Наименование	BioReg№	k_a (1/мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	R_{max} (RU)
1E1.016	8429-3	6,00E+06	1,17E-03	1,95E-10	23,3
11E4	8473-4	2,46E+06	1,34E-03	5,43E-10	35,4
24F1	12483-1	5,33E+06	1,69E-04	3,17E-11	29,8
24F1.001	12486-1	5,45E+06	1,87E-04	3,44E-11	34,8
29E10	12484-1	5,20E+06	1,64E-04	3,15E-11	27,0
31B3.001	12485-1	1,82E+06	4,17E-03	2,29E-09	23,6

Таблица 19. Определение характеристик связывания CD112R (N81D) человека

Наименование	BioReg№	k_a (1/мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	R_{max} (RU)
1E1.016	8429-3	5,26E+06	1,32E-03	2,50E-10	22,1
11E4	8473-4	1,94E+06	1,63E-03	8,41E-10	32,9
24F1	12483-1	4,82E+06	2,44E-04	5,06E-11	28,8
24F1.001	12486-1	4,48E+06	2,66E-04	5,94E-11	33,8
29E10	12484-1	5,04E+06	6,37E-04	1,26E-10	25,7
31B3.001	12485-1	1,82E+06	4,38E-03	2,40E-09	22,5

Фиг. 19А

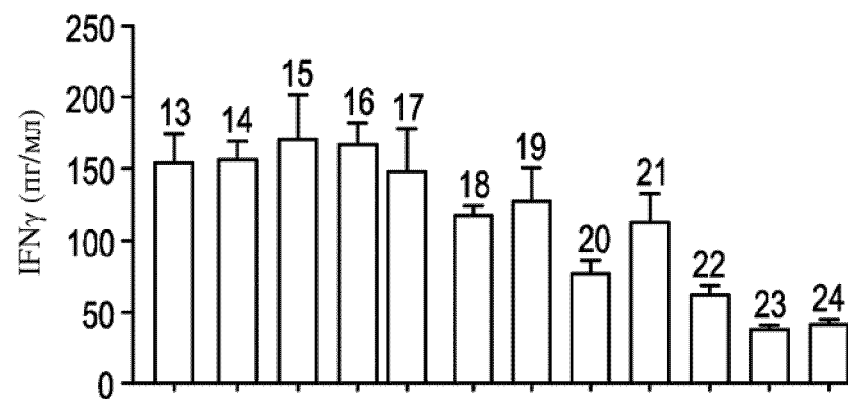
Всего 1,5 нМ: линейный диапазон ответа на дозу



a TIGIT (нМ)	0,9	0,75	0,5	0,25	0,1	0,5	0,9	-	0,9	-	-	-
aCD112R (нМ)	0,1	0,25	0,5	0,75	0,9	0,5	-	0,9	-	0,9	-	-
aPD-1 (нМ)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	-	0,5	0,5	-	-	10	-
Соотношение TIGIT:CD112R	9:1	3:1	1:1	1:3	1:9	-	-	-	-	-	-	-

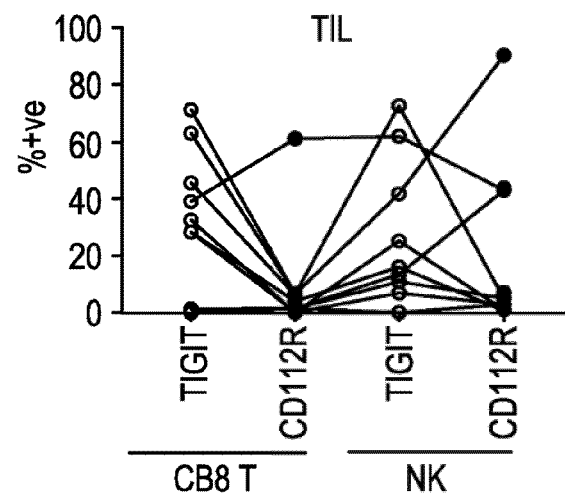
Фиг. 19В

Всего 30 нМ: максимальный диапазон ответа

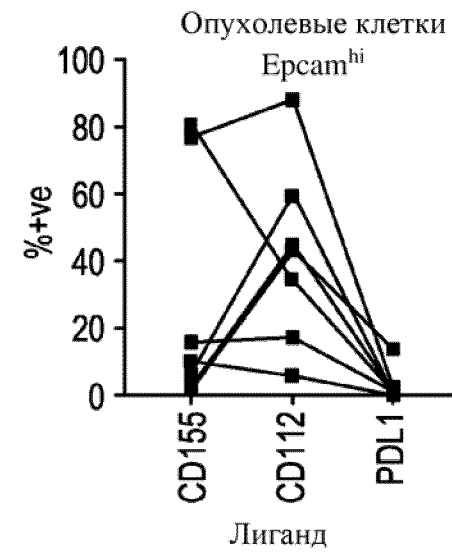


a TIGIT (нМ)	18	15	10	5	2	10	18	-	18	-	-	-
aCD112R (нМ)	2	5	10	15	18	10	-	18	-	18	-	-
aPD-1 (нМ)	10	10	10	10	10	-	10	10	-	-	10	-
Соотношение TIGIT:CD112R	9:1	3:1	1:1	1:3	1:9	-	-	-	-	-	-	-

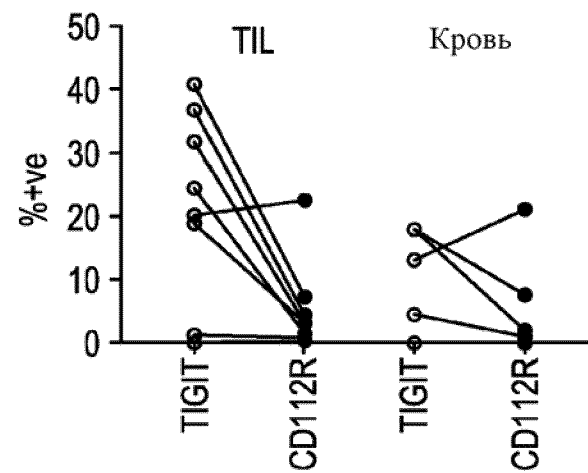
Фиг. 20А



Фиг. 20С

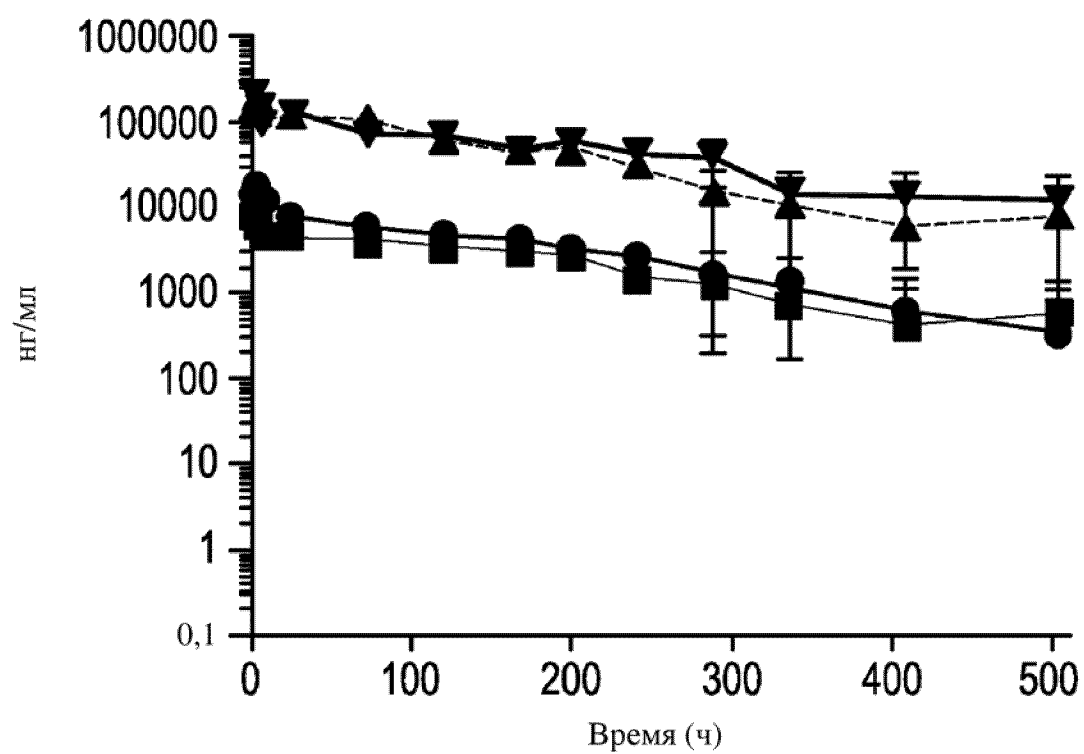


Фиг. 20В



63/74

Фиг. 21

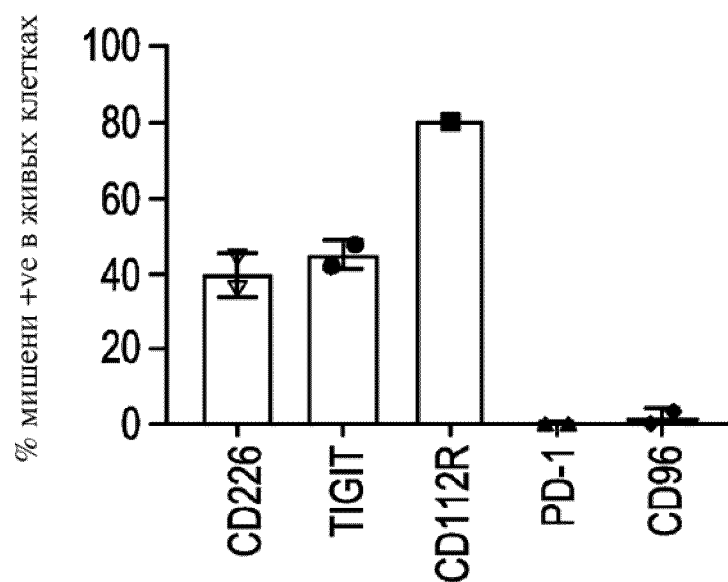


- Группа 1, антитело к TIGIT, 0,5 мг/кг
- Группа 1, антитело к CD112R, 0,5 мг/кг
- ▲ Группа 2, антитело к TIGIT, 5 мг/кг
- ▼ Группа 3, антитело к CD112R, 5 мг/кг

64/74

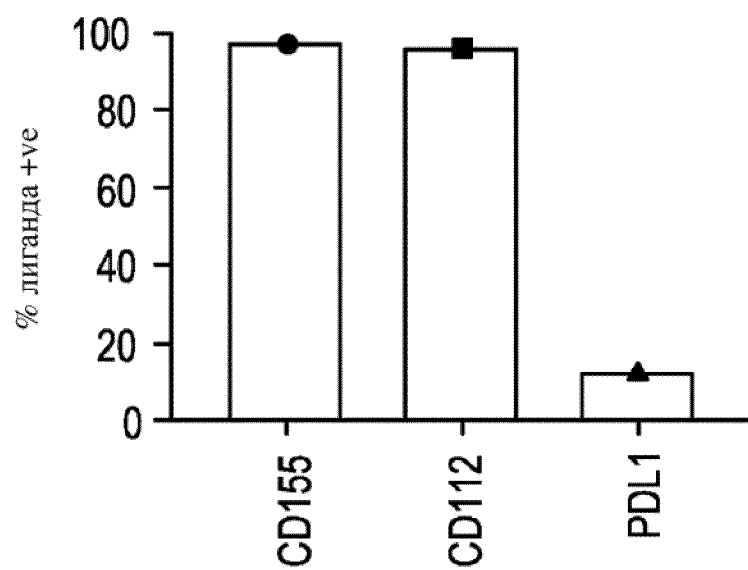
Фиг. 22А

Экспрессия мишени на клеточной
поверхности NK-клеток (CD3-CD56+)



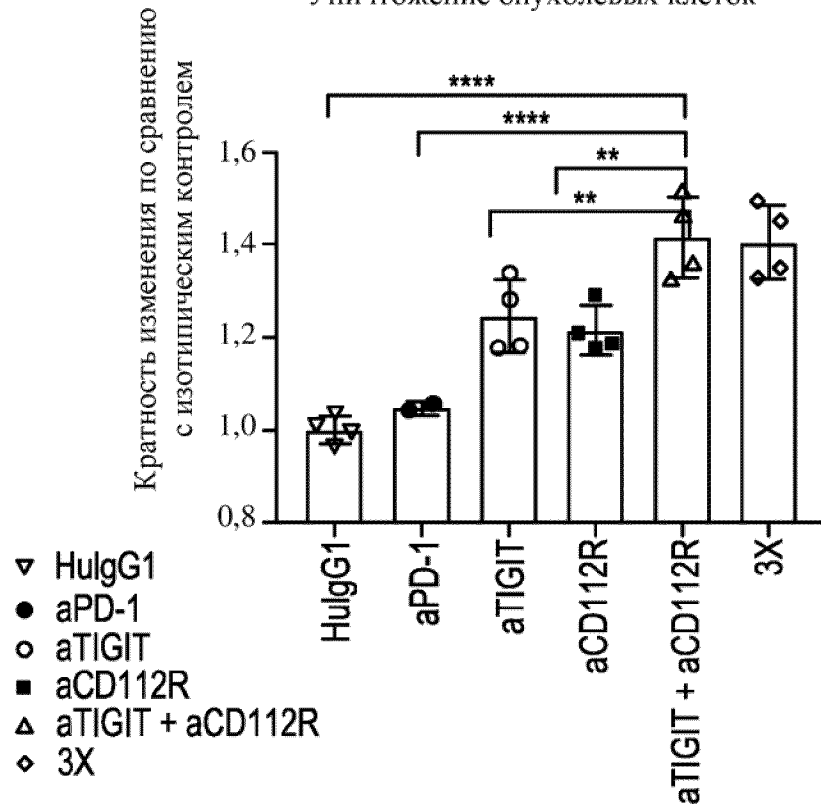
Фиг. 22В

Экспрессия лиганда на поверхности клеток SKBR3

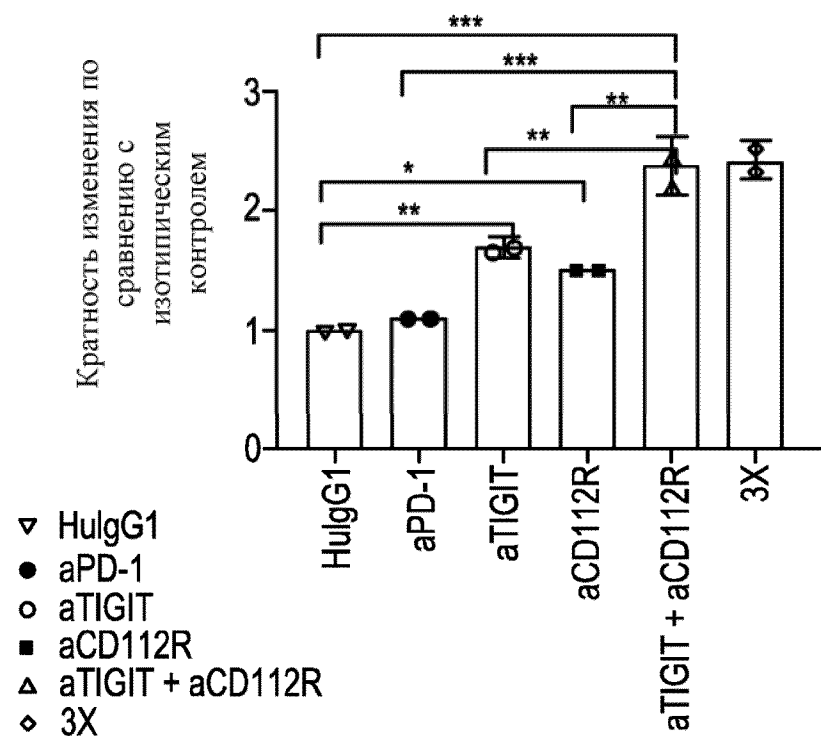


Фиг. 22С

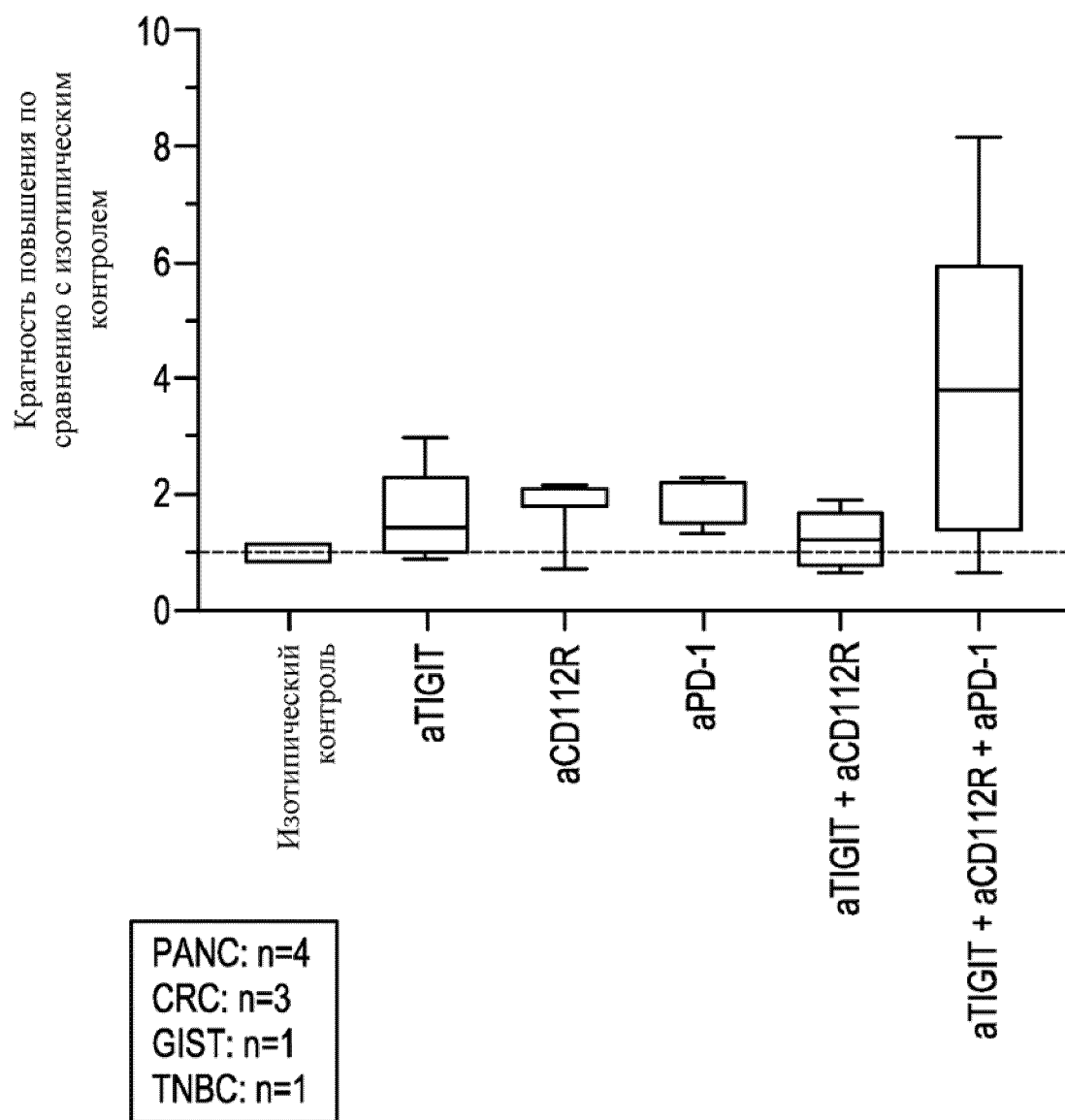
Уничтожение опухолевых клеток



Фиг. 22D

Индукция IFN γ 

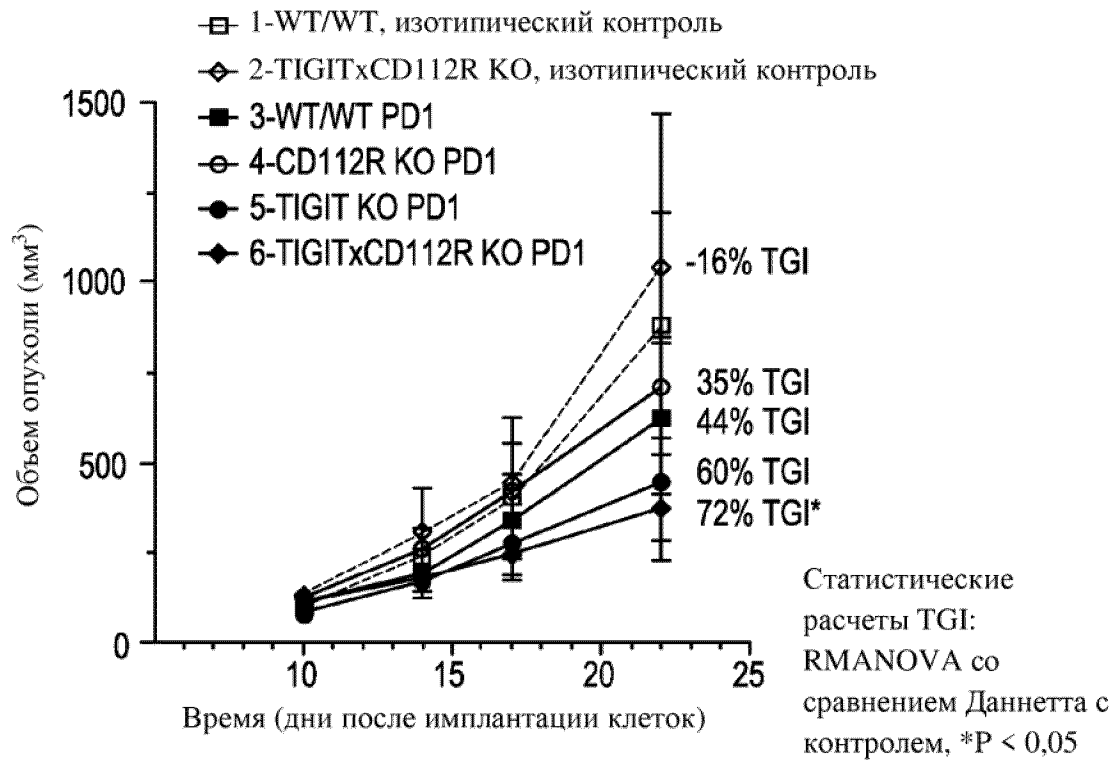
Фиг. 23



67/74

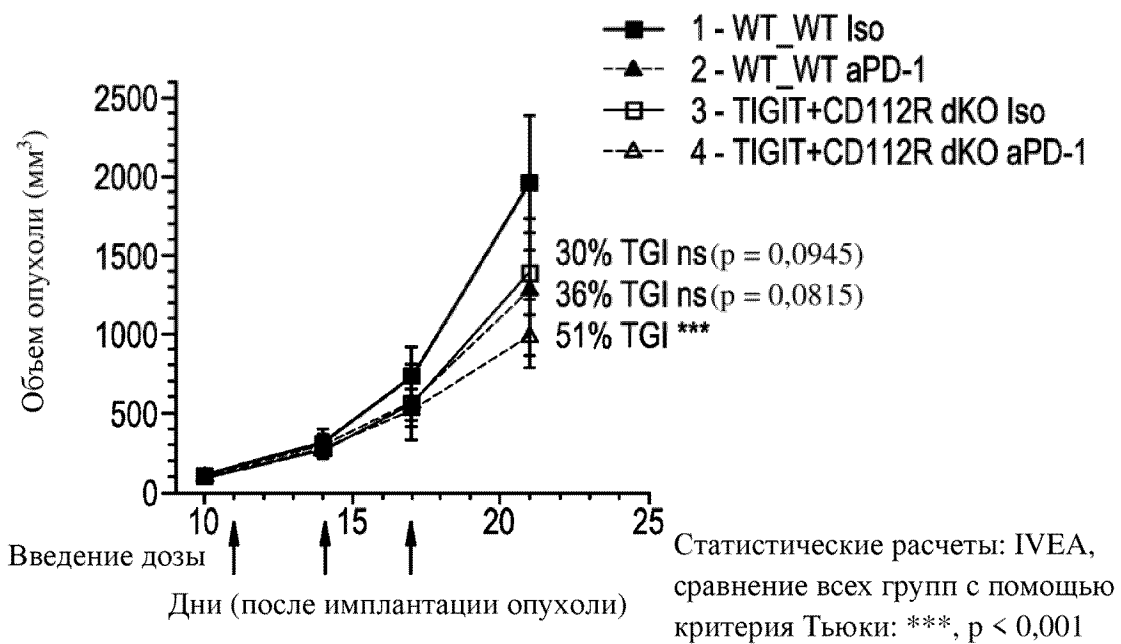
Фиг. 24А

СТ26



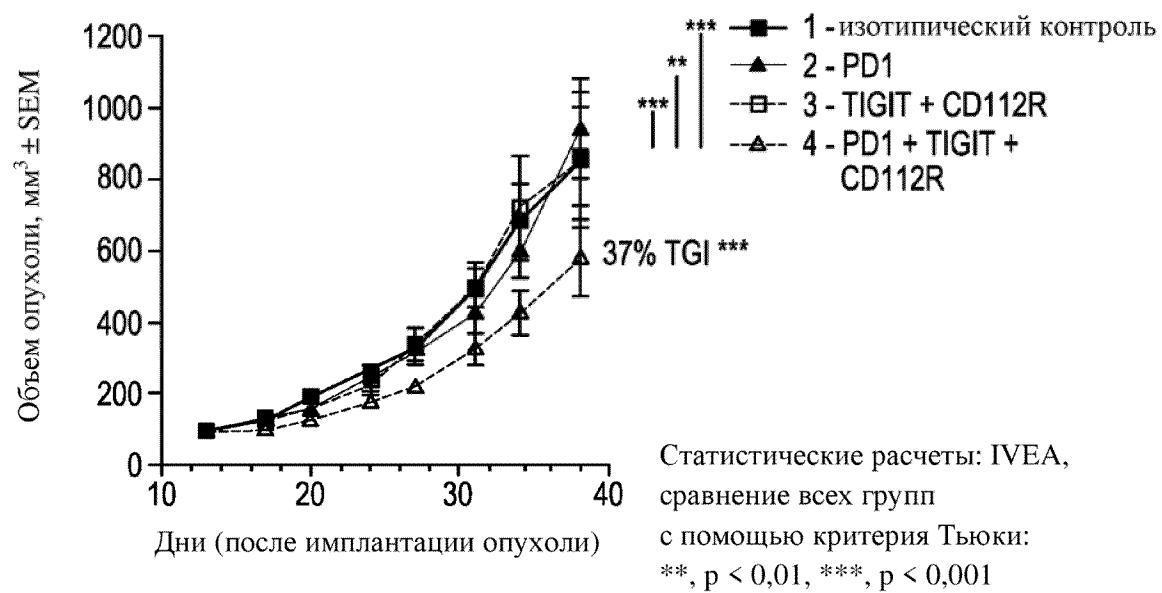
Фиг. 24В

B16F10



Фиг. 24С

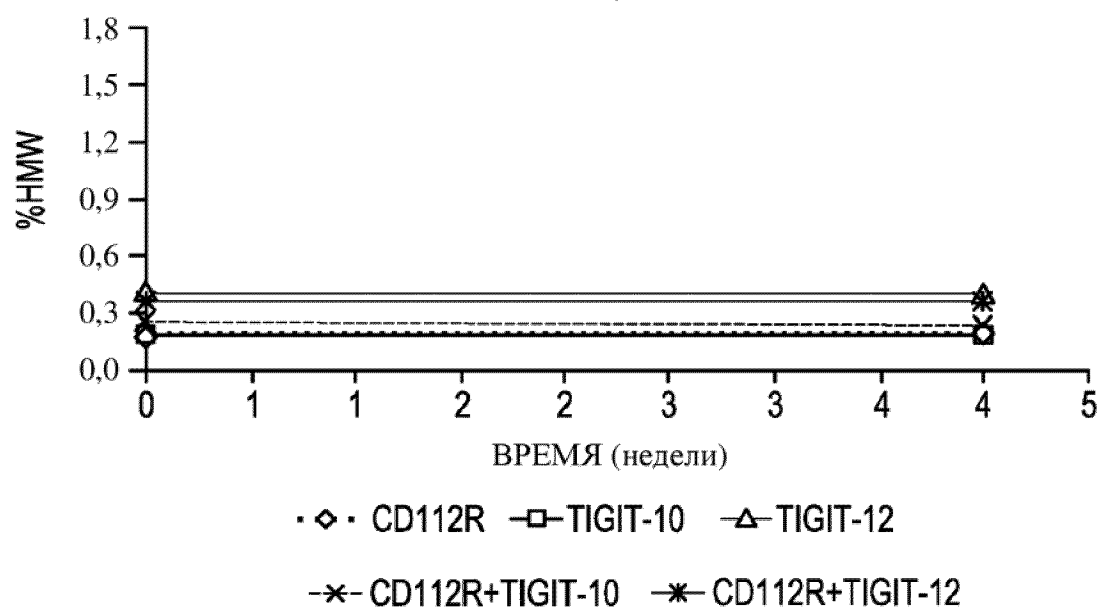
Ксенотрансплантат



69/74

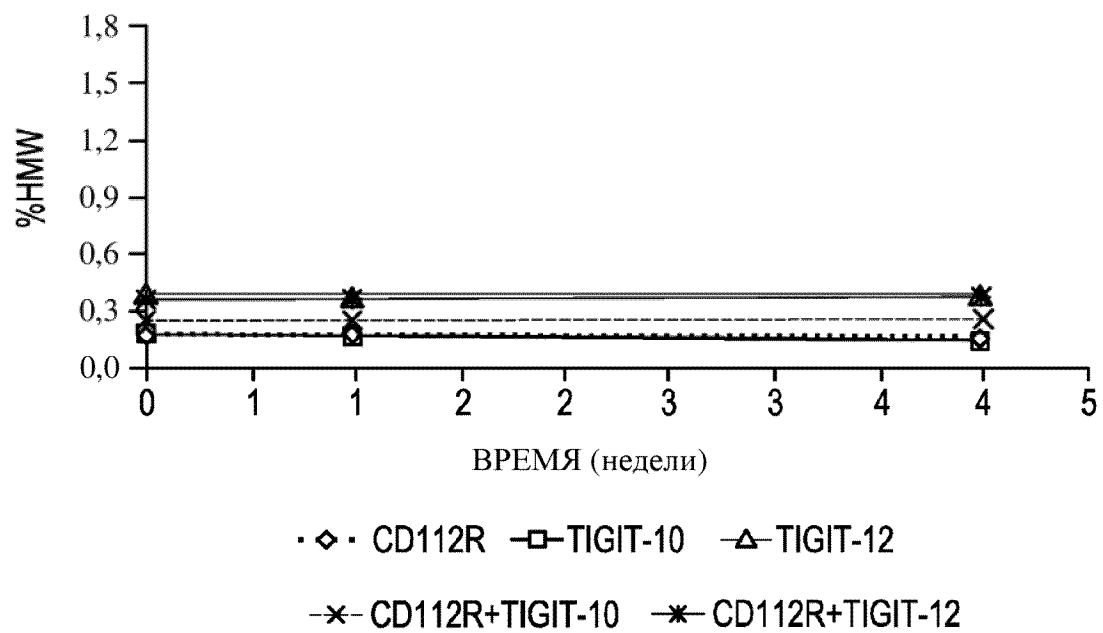
Фиг. 25А

% HMW SEC, -30°C



Фиг. 25В

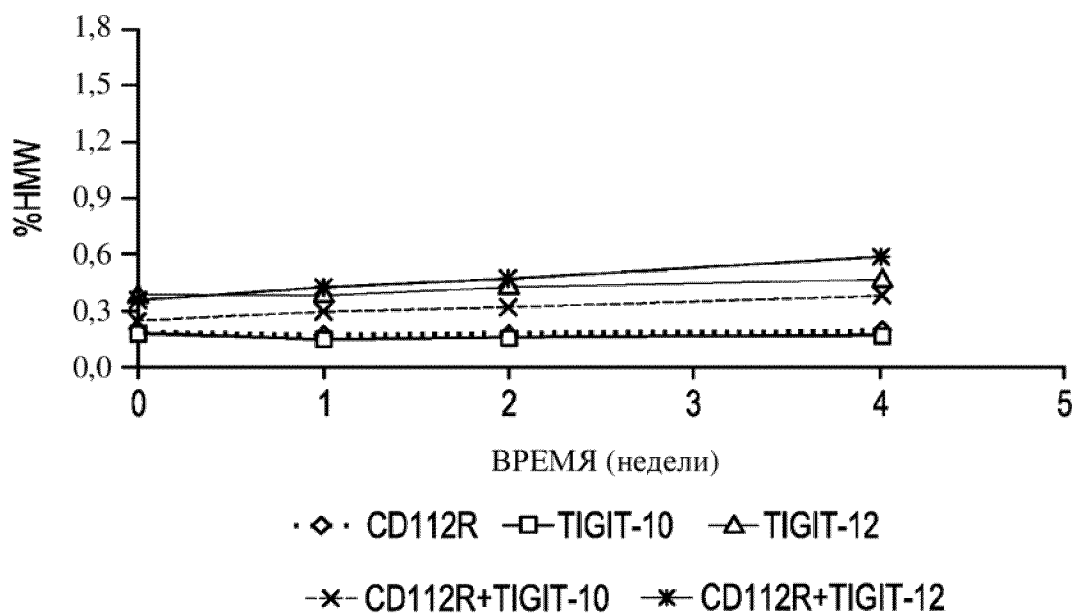
% HMW SEC, 4°C



70/74

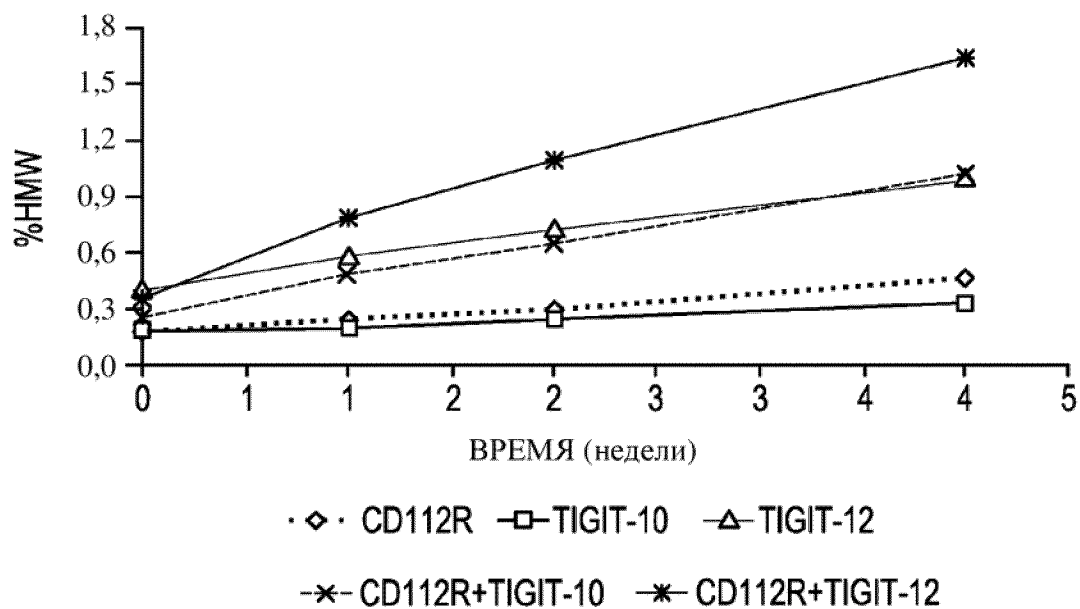
Фиг. 25С

%HMW SEC, 25°C



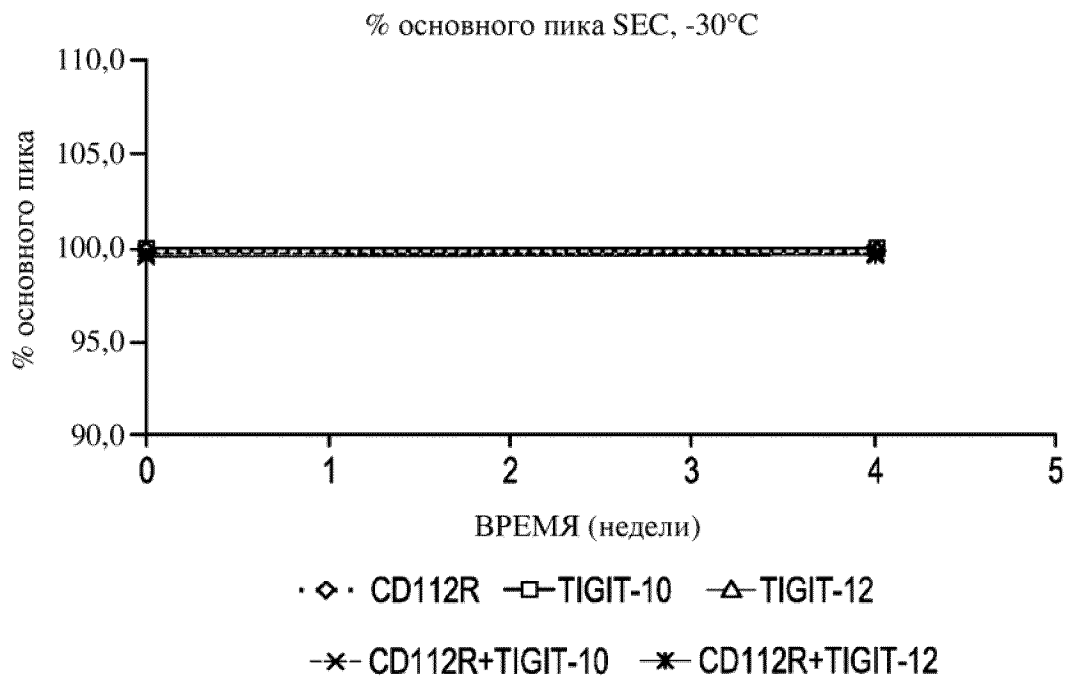
Фиг. 25D

%HMW SEC, 40°C

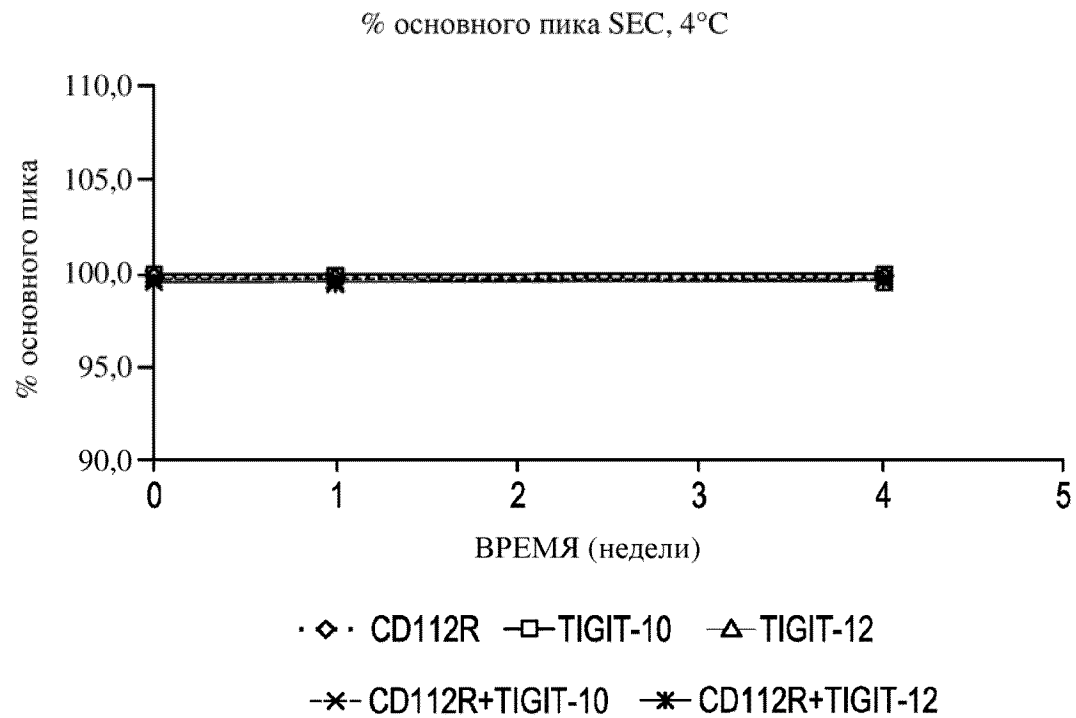


71/74

Фиг. 25Е



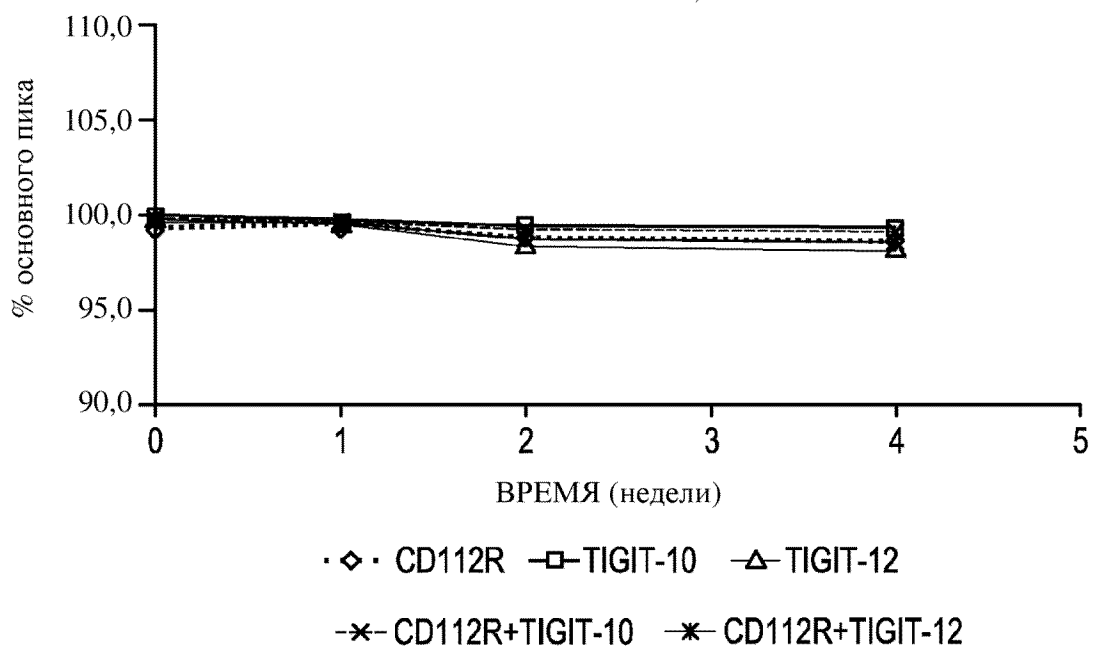
Фиг. 25F



72/74

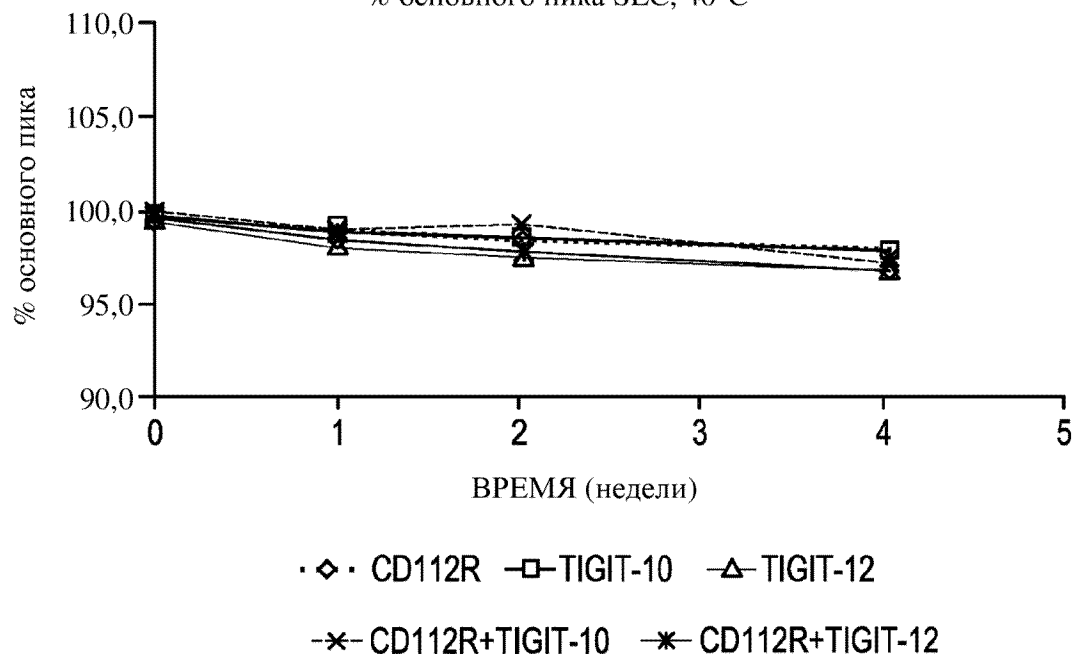
Фиг. 25G

% основного пика SEC, 25°C



Фиг. 25H

% основного пика SEC, 40°C



Фиг. 26

ТАБЛИЦА 28

Кандидат	Скорректированная относительная площадь										
	Пик LMW + MMW										
	T0	1 нед.			2 нед.		4 нед.				
		4C	25C	40C	25C	40C	5x FT	(-30C)	4C	25C	40C
CD112R – 140 mgml	0,0	0,0	0,2	0,3	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,2	1,0
TIGIT-10 – 140 mgml	0,0	0,0	0,3	0,2	0,1	0,7	0,0	0,2	0,0	0,3	1,5
TIGIT-12 – 140 mgml	2,3	2,2	3,0	2,9	3,2	3,1	2,2	2,1	2,5	3,9	3,6
CD112R – 70 mgml	0,0	0,0	0,1	0,3	0,3	0,1	0,0	0,1	0,0	0,2	0,9
TIGIT-10 – 70 mgml	0,0	0,0	0,5	0,2	0,1	0,9	0,1	0,3	0,1	0,3	1,4
TIGIT-12 – 70 mgml	2,1	2,3	2,7	2,9	3,1	3,0	2,2	2,1	2,2	3,5	3,5
CD112R + TIGIT-10, 1 к 1	0,0	0,1	0,3	0,5	0,2	0,8	0,1	0,1	0,1	0,1	1,2
CD112R + TIGIT-12, 1 к 1	0,0	1,1	1,4	1,4	1,2	1,7	1,1	1,1	1,2	1,5	2,1

Фиг. 27

