

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 045974

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.01.24

(21) Номер заявки
202092931

(22) Дата подачи заявки
2019.06.28

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(54) ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ АНТАГОНИСТЫ РЕГУЛЯТОРОВ ИММУННЫХ
КОНТРОЛЬНЫХ ТОЧЕК

(31) 62/691,658; 62/823,989

(32) 2018.06.29; 2019.03.26

(33) US

(43) 2021.05.26

(86) PCT/US2019/039994

(87) WO 2020/006516 2020.01.02

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ДЖЕНСАН БИОФАРМА, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Шэн Джеки З., Лю Бо, Каров
Маргарет, Чжан Вэй, Труонг Хуэ (US)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) US-A1-20170044256
US-A1-20150337033
WO-A1-2018128939

(57) Описаны противоопухолевые антагонисты, которые специфично связываются с регулятором иммунных контрольных точек. Также описан способ лечения пролиферативных расстройств с помощью противоопухолевых антагонистов.

045974 B1

045974 B1

045974

B1

Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США № 62/691 658, поданной 29 июня 2018 г., и предварительной заявке на патент США № 62/823 989, поданной 26 марта 2019 г., содержание которых специально включено в настоящую заявку посредством ссылки.

Область техники

Настоящая заявка в целом относится к лечению рака и, в частности, к биспецифичным ингибиторам, способным модулировать пути, связанные с онкогенезом и противоопухолевым иммунитетом.

Уровень техники

Неспособность организма-хозяина уничтожать раковые клетки остается важной проблемой. Несмотря на то, что появляется все большее количество терапевтических моноклональных антител, одобренных для лечения различных видов рака, часто наблюдается развитие устойчивости к указанным антителам, учитывая множество различных молекулярных путей, лежащих в основе опухолевого роста и прогрессирования до метастазов. Несмотря на то что иммунная система обеспечивает основной механизм предотвращения рака, раковые клетки способны противодействовать иммунологическому надзору. Были идентифицированы естественные механизмы контроля, которые ограничивают активацию Т-клеток для предотвращения побочного повреждения в результате их неограниченной активности. Этот процесс используется опухолевыми клетками для уклонения от иммунных ответов. Восстановление способности эффекторных клеток иммунной системы, в частности Т-лимфоцитов, распознавать и устранять раковые клетки является основной целью иммунотерапии.

Существует необходимость в улучшенных терапевтических антагонистах связывания или антителах и способах лечения рака и хронических вирусных инфекций с помощью таких реагентов.

Краткое описание изобретения

Один аспект настоящего изобретения относится к биспецифичным противоопухолевым антагонистам, содержащим первый нацеливающий домен, который специфично связывается с регулятором иммунных контрольных точек; второй нацеливающий домен в виде scFv, который специфично связывается с TIGIT; и иммуноглобулиновый каркас, структурно связанный с первым и вторым нацеливающими доменами, где указанный первый нацеливающий домен расположен на N-конце антагониста и указанный второй нацеливающий домен расположен на C-конце антагониста и связан с иммуноглобулиновым каркасом с помощью линкера. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, линкер содержит 4 или 6 копий аминокислотной последовательности G4S (4xG4S и 6xG4S соответственно).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, первый нацеливающий домен специфично связывается с PD-1, PD-L1 или LAG-3.

Другой аспект настоящего изобретения относится к гуманизированным антителам против LAG-3, которые ингибируют связывание лигандов с LAG-3.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу лечения клеточного пролиферативного расстройства. Указанный способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества биспецифичного противоопухолевого антагониста или антитела против LAG-3 в соответствии с настоящей заявкой.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показаны последовательности определяющих комплементарность участков (CDR) конкретных mAb против TIGIT. Последовательности каркасных участков (FR), фланкирующие последовательности CDR антитела против TIGIT, перечислены на фиг. 39A как последовательности SEQ ID NO: 216-262.

На фиг. 2A-2C показаны несколько вариантов реализации последовательностей переменного домена антитела против TIGIT.

На фиг. 3 показаны последовательности CDR конкретных mAb против PD-1. Последовательности FR, фланкирующие последовательности CDR антитела против PD-1, перечислены на фиг. 39B как последовательности SEQ ID NO: 263-292.

На фиг. 4A-4B показаны несколько вариантов реализации последовательностей переменного домена антитела против PD-1.

На фиг. 5 показаны последовательности CDR конкретных mAb против PD-L1. Последовательности FR, фланкирующие последовательности CDR антитела против PD-L1, перечислены на фиг. 39C как последовательности SEQ ID NO: 293-315.

На фиг. 6A-6C показаны несколько вариантов реализации последовательностей переменного домена антитела против PD-L1.

На фиг. 7A-7C изображены три примера биспецифичных противоопухолевых антагонистов, Bi-TPM-93 (фиг. 7A), Bi-TPM-94A (фиг. 7B) и Bi-TPM-94B (фиг. 7C).

На фиг. 8 приведен обобщенный порядок расположения функциональных доменов в биспецифичных антагонистах, изображенных на фиг. 7A-7C.

На фиг. 9A-9B показаны аминокислотные последовательности тяжелой цепи (HC) и легкой цепи (LC), соответствующие биспецифичным антагонистам, изображенным на фиг. 7A-7C.

На фиг. 10 изображен анализ блокирования, показывающий, что Bi-TPM-94A обеспечивает более эффективное блокирование взаимодействия между PD-1 и его лигандом PD-L1 (IC₅₀=0,15 нМ) по срав-

нению с Vi-TPM-93 ($IC_{50}=0,83$ нМ).

На фиг. 11 показаны результаты анализа с помощью ПААГ-электрофореза в невосстанавливающих условиях для Vi-TPM-94A и Vi-TPM-94B, временно экспрессируемых в линии клеток почки эмбриона человека 293 (НЕК).

На фиг. 12 показаны результаты анализа с помощью ультравысокоэффективной эксклюзионной жидкостной хроматографии (SE-UHPLC), демонстрирующие гетерогенность по составу образцов Vi-TPM-93 и Vi-TPM-94, которая устраняется путем модификации линкера в Vi-TPM-94B.

На фиг. 13A показано, что аффинность связывания Vi-TPM-94A и Vi-TPM-94B с PD-1 превышает аффинность связывания эталонного антитела против PD-1 с PD-1. На фиг. 13B показано, что аффинность связывания Vi-TPM-94A и Vi-TPM-94B с TIGIT превышает аффинность связывания эталонного антитела против TIGIT с TIGIT.

На фиг. 14A-14B показано, что Vi-TPM-94A и Vi-TPM-94B активно блокируют как связывание TIGIT с его лигандом, PVR человека (CD155) (фиг. 14A), так и связывание PD-1 с его лигандом, PD-L1 (фиг. 14B).

На фиг. 15 показаны результаты ИФА-анализа, демонстрирующие одновременное связывание Vi-TPM-94A и Vi-TPM-94B с PD-1 и TIGIT. В ходе данного анализа покрытые huPD-1-Fc 96-луночные планшеты инкубировали с образцами Vi-TPM-94A и Vi-TPM-94B в серийных разведениях с последующим ингибированием с His-меченным белком huTIGIT, в связи с чем связанные молекулы выявляли с использованием HRP-конъюгированных антител против His-метки и ТМВ-субстрата.

На фиг. 16A-16B показана повышенная секреция $IFN-\gamma$ в МКПК человека (донор 287, фиг. 16A; донор 401, фиг. 16B) в присутствии Vi-TPM-94B по сравнению с отдельными исходными антителами против PD-1 и против TIGIT или их комбинацией, а также отрицательными контролями.

На фиг. 17A-17B показано, что Vi-TPM-94B усиливает пролиферацию первичных Т-клеток человека из МКПК донора 287 (фиг. 17A) и МКПК донора 401 (фиг. 17B) в большей степени по сравнению с отдельными исходными антителами против PD-1 и против TIGIT или их комбинацией, а также отрицательными контролями.

На фиг. 18 представлен фармакокинетический профиль, показывающий, что Vi-TPM-94A и Vi-TPM-94B имеют сходные *in vivo* периоды полувыведения ($T_{1/2}$) после инъекции в хвостовую вену самкам мышей CD1 возрастом 6-10 недель. Биспецифичные антагонисты восстанавливали из сыворотки, отобранной в различное время после инъекции, и подвергали анализу с помощью ИФА.

На фиг. 19A показаны последовательности CDR тяжелой цепи, соответствующие mAb против LAG-3 2L2A.1, 2L2A.6, 2L27B и 3L1A. На фиг. 19B показаны последовательности CDR легкой цепи, соответствующие mAb против LAG-3 2L2A.1, 2L2A.6, 2L27B и 3L1A. Последовательности FR, фланкирующие последовательности CDR антител против LAG-3, перечислены на фиг. 39C как SEQ ID NO: 316-337.

На фиг. 20 показаны последовательности VH и VL mAb против LAG-3 2L2A.1, 2L2A.6, 2L27B и 3L1A.

На фиг. 21A-21B показаны результаты анализа, подтверждающие способность антител mAb против LAG-3 блокировать связывание с LAG-3.

На фиг. 22 показаны результаты клеточного анализа блокирования, оценивающего способность mAb против LAG-3 2L2A.1, эталонного (BM) mAb против LAG-3 и гибридного антитела 2L2A (SEQ ID NO: 203 и 204) блокировать взаимодействие между LAG-3- μ Fc и его главным лигандом, антигеном главного комплекса гистосовместимости (MHC), экспрессируемым на клетках Raji. Данные анализа использовали для расчета представленных значений IC_{50} (нМ).

На фиг. 23A-23B показан анализ аффинности связывания mAb против LAG-3 2L2A.1 с человеческим LAG-3-His (фиг. 23A) или человеческим LAG-3-mIgG2a (фиг. 23B) по результатам поверхностного плазмонного резонанса (SPR) наряду с соответствующими константами аффинности связывания.

На фиг. 24 показано связывание варианта mAb против LAG-3, 2L2A.1, или эталонного антитела (BM) с LAG-3, включая полумаксимальные эффективные концентрации (EC_{50}), вызывающие эффект, имеющий среднее значение между исходным и максимальным уровнем.

На фиг. 25 показан анализ с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в неденатурирующих условиях для гуманизированного варианта mAb против LAG-3 2L2A.1, временно экспрессируемого клетками НЕК293. Положительный контроль представлял собой HybPL1 (1PL11 CDRg-VH: 1PL25 CDRg-VL).

На фиг. 26 представлен FACS-анализ, показывающий коэкспрессию LAG-3 и PD-1 в активированных $CD3^+$ Т-клетках человека.

На фиг. 27A-27B показана продукция $IFN-\gamma$ МКПК от двух доноров (донор 0105, фиг. 27A; донор 0817, фиг. 27B) стимулировали стафилококковым энтеротоксином В (SEB; дорожки 2-4) или не стимулировали SEB (дорожка 1) в 96-луночном планшете. После стимуляции МКПК доноров инкубировали в отсутствие антител (дорожки 1, 2), в присутствии эталонного антитела против LAG-3 (BM) (дорожка 3) или mAb против LAG-3, 2L2A.1. Результаты данного анализа показали, что 2L2A.1 вызывают более высокую продукцию $IFN-\gamma$ в МКПК обоих доноров по сравнению с эталонным антителом против LAG-3.

На фиг. 28А-28С показана повышенная продукция $IFN-\gamma$ в человеческих МКПК от трех доноров (донор 223, фиг. 28А; донор 224, фиг. 28В; донор 225, фиг. 28С), стимулированных SEB (дорожка 2-4) или не стимулированных SEB (дорожка 1). Кроме того, МКПК доноров инкубировали в отсутствие антител (дорожки 1, 2), в присутствии эталонного (ВМ) антитела против LAG-3 (дорожка 3) или mAb против LAG-3 2L2A. 1.

На фиг. 29А-29С показано, что mAb против LAG-3 2L2A. 1 усиливает пролиферацию первичных Т-клеток человека из донора 223 (фиг. 29А), донора 224 (фиг. 29В) и донора 225 (фиг. 29С) в большей степени по сравнению с эталонным антителом против LAG-3.

На фиг. 30А-30В изображены два примера биспецифичных противоопухолевых антагонистов, Vi-LT-1 (фиг. 30А) и Vi-LT-3 (фиг. 30В).

На фиг. 31 приведен обобщенный порядок расположения функциональных доменов в биспецифичных антагонистах, изображенных на фиг. 30А-30В.

На фиг. 32 показаны аминокислотные последовательности тяжелой цепи (HC) и легкой цепи (LC), соответствующие биспецифичным антагонистам, изображенным на фиг. 30А-30В.

На фиг. 33А-33В показаны результаты клеточного анализа блокирования, с помощью которого измеряли способность биспецифичных антагонистов LT-1 и LT-3 и биспецифичного антагониста Vi-TRM-94В или эталонного mAb против LAG-3 блокировать взаимодействие между LAG-3- μFc и его главным лигандом, антигеном главного комплекса гистосовместимости (MHC), экспрессируемым на клетках Raji (фиг. 33А), или блокировать взаимодействие между TIGIT и его лигандом, PVR человека (CD155) (фиг. 33В). Данные анализа использовали для расчета представленных значений IC_{50} (нМ).

На фиг. 34 показаны результаты ИФА-анализа, демонстрирующие одновременное связывание Vi-LT-1, Vi-LT-3 или исходных mAb против LAG-3 с LAG-3 и TIGIT. В ходе данного анализа покрытые LAG-3- μFc 96-луночные планшеты инкубировали с образцами Vi-LT-1, Vi-LT-3 или исходного mAb против LAG-3 в серийных разведениях с последующим ингибированием с His-меченным белком huTIGIT, в связи с чем связанные молекулы выявляли с использованием конъюгированных с HRP антител против His-метки и ТМВ-субстрата. Данные анализа использовали для расчета представленных значений EC_{50} (нМ).

На фиг. 35А-35D изображены фармакокинетические профили и *in vivo* периоды полувыведения ($T_{1/2}$), соответствующие исходным mAb против LAG-3 (фиг. 35А), эталонному mAb против LAG-3 (фиг. 35В), Vi-LT-1 (фиг. 35С) или Vi-LT-3 (фиг. 35D) после инъекции в хвостовую вену самкам мышей CD1 возрастом 6-10 недель. Антитела и биспецифичные антагонисты восстанавливали из сыворотки, отобранной в различное время после инъекции, и подвергали анализу с помощью ИФА. $T_{1/2}$ для исходного mAb против LAG-3, Vi-LT-1 и Vi-LT-3 составлял от пяти до шести дней, $T_{1/2}$ для ВМ mAb против LAG-3 составлял либо 2 дня (мышь 3), либо 7 дней (мышь 4).

На фиг. 36А показан профиль эксклюзионной хроматографии (SEC) для Vi-LT-1 и Vi-LT-3, показывающий гомогенность и хорошую стабильность при 4°C через 7 дней. На фиг. 36В показаны результаты анализа с помощью ультравысокоэффективной эксклюзионной жидкостной хроматографии (SE-UHPLC), иллюстрирующие гомогенность по составу очищенных с помощью белка А Vi-LT-1 и Vi-LT-3, как видно по низкому уровню высокомолекулярных (high molecular weight, HMW) продуктов на 0 и 7 день (1,3%, 1,5% соответственно для Vi-LT-1 и 1,3%, 1,4% соответственно для Vi-LT-3) и низкомолекулярных (low molecular weight, LMW) продуктов на 0 и 7 день (0,2%, 0,2% соответственно для Vi-LT-1 и 0,3%, 0,5% соответственно для Vi-LT-3) по сравнению с димерными продуктами на 0 и 7 день (98,4%, 98,3% соответственно для Vi-LT-1 и 98,4%, 98,1% соответственно для Vi-LT-3).

На фиг. 37А-37В показана продукция $IFN-\gamma$ в МКПК человека, стимулированных стафилококковым энтеротоксином В (SEB; дорожки 2-8) или не стимулированных SEB (дорожка 1) в присутствии клеток SHP-77 (фиг. 37А) или клеток H358 (фиг. 37В) с последующей инкубацией в отсутствие антитела (дорожки 1, 2); в присутствии человеческого IgG (дорожка 3); в присутствии исходного mAb против TIGIT B21-35 (дорожка 4); в присутствии исходного mAb против LAG-3 2L2A.1 (дорожка 5); в присутствии исходных mAb против TIGIT B21-35 и mAb против LAG-3 2L2A. 1 (дорожка 6); Vi-LT-1 (дорожка 7) и Vi-LT-3 (дорожка 8).

На фиг. 38 показана пролиферация CD4 Т-клеток из МКПК человека, стимулированных SEB, в присутствии клеток SHP-77 (дорожки 2-8) и контрольного человеческого IgG (дорожка 3), mAb против TIGIT B21-35 (дорожка 4), mAb против LAG-3 (дорожка 5), комбинации mAb против TIGIT и mAb против LAG-3 (дорожка 6), Vi-LT-1 (дорожка 7) или Vi-LT-3 (дорожка 8).

На фиг. 39А показаны каркасные участки (FR), соответствующие CDR против TIGIT на фиг. 1. На фиг. 39В показаны FR, соответствующие CDR против PD-1 на фиг. 3. На фиг. 39С показаны FR, соответствующие CDR против PD-L1 на фиг. 5, и FR, соответствующие CDR против LAG-3 на фиг. 19А и 19В.

Подробное описание

Определения

Если иное не указано, все технические и научные термины, используемые в настоящей заявке, имеют такие же значения, как обычно принятые специалистами в данной области техники, к которой

относятся описанные способ и композиции. Следует отметить, что употребление в настоящей заявке и прилагаемой формуле изобретения предметов в единственном числе включает множественную форму указанных предметов, если иное явно не следует из контекста. Таким образом, например, ссылка на "пептид" включает "один или более" пептидов или "множество" таких пептидов. В соответствии с идеями настоящего изобретения, любой опубликованный патент или публикация патентной заявки, описанная в настоящей заявке, специально включена в настоящую заявку посредством ссылки.

При использовании в настоящей заявке термин "TIGIT" относится к любой форме TIGIT и его вариантам, которые сохраняют, по меньшей мере частично, активность TIGIT. Если иное не указано, например, с помощью конкретной ссылки на TIGIT человека, TIGIT включает нативные последовательности TIGIT всех видов млекопитающих, например, человека, собак, кошек, лошадей и коров.

При использовании в настоящей заявке термин "PD-1" относится к любой форме PD-1 и его вариантам, которые сохраняют, по меньшей мере частично, активность PD-1. Если иное не указано, например, с помощью конкретной ссылки на человеческий PD-1, PD-1 включает нативные последовательности PD-1 всех видов млекопитающих, например, человека, собак, кошек, лошадей и коров.

При использовании в настоящей заявке термин "PD-L1" относится к любой форме PD-L1 и его вариантам, которые сохраняют, по меньшей мере частично, активность PD-L1. Если иное не указано, например, с помощью конкретной ссылки на человеческий PD-L1, PD-L1 включает нативные последовательности PD-L1 всех видов млекопитающих, например, человека, собак, кошек, лошадей и коров.

Термин "агонист" относится к веществу, которое способствует (т.е. индуцирует, стимулирует, усиливает или увеличивает) биологическую активность или эффект другой молекулы. Термин агонист включает вещества, которые связываются с рецептором, такие как антитело, и вещества, которые способствуют функции рецептора без связывания с ним (например, путем активации ассоциированного белка).

Термин "антагонист" или "ингибитор" относится к веществу, которое предотвращает, блокирует, ингибирует, нейтрализует или снижает биологическую активность или эффект другой молекулы, такой как рецептор или лиганд. Антагонист может представлять собой моноспецифичное антитело или биспецифичное антитело.

При использовании в настоящей заявке термин "антитело" относится к полипептиду или полипептидному комплексу, который специфично распознает антиген и связывается с ним с помощью одной или более переменных областей иммуноглобулинов. Антитело может представлять собой полноразмерное антитело, его антигенсвязывающий фрагмент или одну цепь. Термин "антитело" включает различные широкие классы полипептидов, которые можно различать биохимически. Специалистам в данной области техники будет очевидно, что тяжелые цепи классифицируют как альфа, дельта, эpsilon, гамма и мю (или α , δ , ϵ , γ и μ), при этом некоторые из них имеют подклассы (например, $\gamma 1$ - $\gamma 4$). Природа этих цепей определяет "класс" антитела как IgG, IgM, IgA, IgG или IgE соответственно. Подклассы (изотипы) иммуноглобулинов, например IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 и т.д., хорошо охарактеризованы и, как известно, отвечают за функциональную специализацию. Специалист в данной области техники легко определит модифицированные версии каждого из указанных классов и изотипов с учетом настоящего изобретения. Соответственно, указанные модифицированные версии находятся в пределах объема настоящего изобретения, и все классы иммуноглобулинов находятся в пределах объема настоящего изобретения. Следующее далее обсуждение будет в целом относиться к классу молекул иммуноглобулинов IgG.

Антитела согласно настоящему изобретению включают, но не ограничиваются указанными, поликлональные, моноклональные, мультиспецифичные, биспецифичные, человеческие, гуманизированные, приматизированные, гибридные и одноцепочечные антитела. Описанные в настоящей заявке антитела могут происходить из любого животного, включая птиц и млекопитающих. Предпочтительно антитела представляют собой антитела человека, мыши, крысы, осла, кролика, козы, морской свинки, верблюда, ламы, лошади или курицы. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, переменная область может происходить из хрящевых рыб (например, из акул).

Термины "фрагмент антитела" и "антигенсвязывающий фрагмент" используются по отношению к части антитела, такой как F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab, Fv, одноцепочечные Fv(scFv), одноцепочечные антитела, связанные дисульфидной связью Fv-фрагменты (sdFv), фрагменты, содержащие домен VL или VH, фрагменты, полученные с помощью библиотеки экспрессии Fab, и антиидиотипические антитела (против Id). Независимо от структуры, фрагмент антитела связывается с тем же антигеном, который распознается интактным антителом. Термин "фрагмент антитела" включает DART и диатела. Термин "фрагмент антитела" также включает любые синтетические или генно-инженерные белки, содержащие переменные области иммуноглобулина, которые действуют как антитело, связываясь со специфичным антигеном с образованием комплекса. "Переменный одноцепочечный фрагмент", или "scFv", относится к белку слияния переменных областей тяжелой (VH) и легкой цепей (VL) иммуноглобулинов. Согласно некоторым аспектам, указанные области связаны с помощью короткого линкерного пептида, состоящего из от десяти до примерно 25 аминокислот. Линкер может быть обогащен глицином для придания гибкости, а также серином или треонином для повышения растворимости и может соединять N-конец VH с C-концом VL или наоборот. Указанный белок сохраняет специфичность исходного иммуноглобулина, не-

смотря на удаление константных областей и введение линкера. В случае IgG стандартная молекула иммуноглобулина содержит два идентичных полипептида легкой цепи с молекулярной массой примерно 23000 дальтон и два идентичных полипептида тяжелой цепи с молекулярной массой 53000-70000 дальтон. Четыре цепи, как правило, соединены с помощью дисульфидных связей в конфигурации "Y", где соединение легких цепей с тяжелыми цепями начинается от развилки структуры "Y" и продолжается через переменную область.

Как легкие, так и тяжелые цепи разделены на участки структурной и функциональной гомологии. Термины "константный" и "переменный" используются в функциональном смысле. В этом отношении следует понимать, что переменные домены частей легкой (VL) и тяжелой (VH) цепей определяют распознавание антигена и специфичность. Напротив, константные домены легкой цепи (CL) и тяжелой цепи (CH1, CH2 или CH3) придают важные биологические свойства, такие как секреция, трансплацентарная подвижность, связывание с Fc-рецептором, связывание комплемента и т.п. Традиционно нумерация доменов константной области в обычных антителах увеличивается по мере их удаления от антигенсвязывающего сайта или аминоконца антитела. В обычных антителах N-концевая часть представляет собой переменную область, а C-концевая часть представляет собой константную область; домены CH3 и CL фактически содержат карбокси-конец тяжелой и легкой цепи соответственно.

Как указано выше, переменная область позволяет антителу селективно распознавать и специфично связываться с эпитопами на антигенах. То есть домен VL и домен VH или набор определяющих комплементарность участков (CDR) антитела объединяются с образованием переменной области, которая определяет трехмерный антигенсвязывающий сайт. Эта четвертичная структура антитела образует антигенсвязывающий сайт, присутствующий на конце каждого плеча Y-структуры. Более конкретно, антигенсвязывающий сайт определяется тремя CDR на каждой из цепей VH и VL (т.е. HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3). В некоторых случаях, например, определенные молекулы иммуноглобулинов происходят из видов семейства верблюдовых или сконструированы на основе иммуноглобулинов верблюдовых. Альтернативно, молекула иммуноглобулина может состоять только из тяжелых цепей с отсутствием легких цепей или только из легких цепей с отсутствием тяжелых цепей.

В природных антителах шесть CDR, присутствующих в каждом антигенсвязывающем домене, представляют собой короткие несмежные последовательности аминокислот, которые имеют специфическое расположение, приводящее к образованию антигенсвязывающего домена, поскольку антитело принимает свою трехмерную конфигурацию в водной среде. Остальные аминокислоты в антигенсвязывающих доменах, называемые "каркасными" участками, обладают менее выраженной межмолекулярной переменностью. Каркасные участки в значительной степени принимают конформацию β -листа, а CDR образуют петли, которые соединяют и в некоторых случаях образуют часть структуры β -листа. Таким образом, каркасные участки образуют каркас, который обеспечивает правильную ориентацию CDR за счет межцепочечных нековалентных взаимодействий. Антигенсвязывающий домен, образованный расположенными в определенном положении CDR, определяет поверхность, комплементарную эпитопу на иммунореактивном антигене. Эта комплементарная поверхность способствует нековалентному связыванию антитела с его когнатным эпитопом. Специалист в данной области техники легко сможет идентифицировать аминокислоты, входящие в состав CDR и каркасных участков соответственно для любой данной переменной области тяжелой или легкой цепи, поскольку они были точно определены.

При использовании в настоящей заявке термины "VH1" и "VH2" относятся к переменным доменам тяжелой цепи иммуноглобулина, соответствующим двум различным специфичностям связывания. Подобным образом, термины "VL1" и "VL2" относятся к переменным доменам легкой цепи, соответствующим двум различным специфичностям связывания. Следует понимать, что области VH1 и VL1 при совместном использовании определяют общую специфичность связывания, а домены VH2 и VL2 определяют вторую специфичность связывания.

При использовании в настоящей заявке термин "каркасный участок (FR)" относится к остаткам переменной области, отличным от остатков CDR. Каждый переменный домен обычно содержит четыре FR, фланкирующие соответствующие CDR. Например, домен VH, как правило, имеет четыре HFR: HFR1, HFR2, HFR3 и HFR4, фланкирующие три HCDR в конфигурации HFR1-HCDR1-HFR2-HCDR2-HFR3-HCDR3-HFR4. Подобным образом, домен LH, как правило, имеет четыре LFR, фланкирующих три LCDR в конфигурации: LFR1-LCDR1-LFR2-LCDR2-LFR3-LCDR3-LFR4. Примеры FR, которые можно использовать в антагонистах, описанных в настоящей заявке, суммированы на фиг. 39A-39C.

Легкие цепи классифицируются как каппа или лямбда (K , λ). Каждый класс тяжелой цепи может быть связан с легкой цепью каппа или лямбда. В целом, легкая и тяжелая цепи ковалентно связаны друг с другом, а "хвостовые" части двух тяжелых цепей связаны друг с другом ковалентными дисульфидными связями или нековалентными связями, когда иммуноглобулины создают с помощью гибридом, В-клеток или генно-инженерных клеток-хозяев. В тяжелой цепи аминокислотные последовательности проходят от N-конца на разветвленных концах Y-структуры до C-конца в нижней части каждой цепи.

При использовании в настоящей заявке термины "константная область легкой цепи" или "CL" используются взаимозаменяемо со ссылкой на аминокислотные последовательности, происходящие из лег-

кой цепи антитела. Предпочтительно константную область легкой цепи содержит по меньшей мере один из константного каппа-домена или константного ламбда-домена.

При использовании в настоящей заявке термин "константная область тяжелой цепи" включает аминокислотные последовательности, происходящие из тяжелой цепи иммуноглобулина. Полипептид, содержащий константную область тяжелой цепи, содержит по меньшей мере одно из домена СН1, шарнирного домена (например, верхней, средней и/или нижней шарнирной области), домена СН2, домена СН3 или его варианта или фрагмента. Например, антигенсвязывающий полипептид для применения согласно изобретению может содержать полипептидную цепь, содержащую домен СН1; полипептидную цепь, содержащую домен СН1, по меньшей мере часть шарнирного домена и домен СН2; полипептидную цепь, содержащую домен СН1 и домен СН3; полипептидную цепь, содержащую домен СН1, по меньшей мере часть шарнирного домена и домен СН3, или полипептидную цепь, содержащую домен СН1, по меньшей мере часть шарнирного домена, домен СН2 и домен СН3. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, полипептид согласно изобретению содержит полипептидную цепь, содержащую домен СН3. Кроме того, в антителе для применения согласно изобретению может отсутствовать по меньшей мере часть домена СН2 (например, весь домен СН2 или его часть). Следует понимать, что константная область тяжелой цепи может быть модифицирована таким образом, чтобы его аминокислотная последовательность отличалась от природной молекулы иммуноглобулина. Например, авторы настоящей заявки обнаружили, что Fc-петля в домене СН3 может быть устойчива к введению значительных вставок или может вмещать значительные вставки (например, более 100 аминокислот).

Константная область тяжелой цепи антитела, описанного в настоящей заявке, может происходить из различных молекул иммуноглобулинов. Например, константная область тяжелой цепи полипептида может содержать домен СН1, происходящий из молекулы IgG1, и шарнирную область, происходящую из молекулы IgG3. В другом примере константная область тяжелой цепи может содержать шарнирный участок, происходящий частично из молекулы IgG1 и частично из молекулы IgG3. В другом примере часть тяжелой цепи может содержать гибридный шарнирный участок, происходящий частично из молекулы IgG1 и частично из молекулы IgG4.

"Пара легкая цепь-тяжелая цепь" относится к набору легкой цепи и тяжелой цепи, которые могут образовывать димер с помощью дисульфидной связи между доменом CL легкой цепи и доменом СН1 тяжелой цепи.

Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации константных областей различных классов иммуноглобулинов хорошо известны. Используемый в настоящей заявке термин "домен VH" включает аминоконцевой вариабельный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, а термин "домен СН1" включает первый (наиболее близкий к аминоконцу) домен константной области тяжелой цепи иммуноглобулина. Домен СН1 примыкает к домену VH и является аминоконцевым по отношению к шарнирному области молекулы тяжелой цепи иммуноглобулина.

При использовании в настоящей заявке термин "домен СН2" включает часть молекулы тяжелой цепи, которая простирается, например, от примерно остатка 244 до остатка 360 антитела в соответствии с обычными схемами нумерации (остатки 244-360, система нумерации по Кабату; и остатки 231-340, система EU-нумерации). Домен СН2 уникален тем, что он не спарен плотно с другим доменом. Скорее две N-связанные разветвленные углеводные цепи расположены между двумя доменами СН2 интактной нативной молекулы IgG. Домен СН3 простирается от домена СН2 до C-конца молекулы IgG и содержит примерно 108 остатков.

При использовании в настоящей заявке термин "шарнирный участок" включает часть молекулы тяжелой цепи, которая соединяет домен СН1 с доменом СН2. Указанный шарнирный участок содержит примерно 25 остатков и является гибким, позволяя таким образом двум N-концевым антигенсвязывающим участкам двигаться независимо. Шарнирные области можно разделить на три отдельных домена: верхний, средний и нижний шарнирные домены.

При использовании в настоящей заявке термин "дисульфидная связь" включает ковалентную связь, образованную между двумя атомами серы. Аминокислота цистеин содержит тиоловую группу, которая может образовывать дисульфидную связь или мостик со второй тиоловой группой. В большинстве природных молекул IgG участки СН1 и CL связаны дисульфидной связью, а две тяжелые цепи связаны с помощью двух дисульфидных связей в положениях, соответствующих 239 и 242 при использовании системы нумерации по Кабату (положение 226 или 229, по системе EU-нумерации).

При использовании в настоящей заявке термин "вариант" антитела, фрагмента антитела или домена антитела относится к антителу, фрагменту антитела или домену антитела, последовательность которого (1) по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности исходного антитела, фрагмента антитела или домена антитела, и (2) которое специфично связывается с той же мишенью, с которой специфично связывается исходное антитело, фрагмент антитела или домен антитела. Следует понимать, что если мера идентичности последовательностей описана в виде фразы "по меньшей мере на x% идентичны" или "по меньшей мере x% идентичность", такой вариант реализации включает любые и все значения процентов, представленные

целым числом, равные или превышающие нижний предел. Кроме того, следует понимать, что когда в настоящей заявке представлена аминокислотная последовательность, она рассматривается как дополнительно описывающая или включающая аминокислотные последовательности, которые имеют по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере 99% идентичности с указанной аминокислотной последовательностью.

При использовании в настоящей заявке фраза "гуманизированное антитело" относится к антителу, происходящему из нечеловеческого антитела, как правило, мышиноного моноклонального антитела. В качестве альтернативы, гуманизированное антитело может происходить из гибридного антитела, которое сохраняет или в значительной степени сохраняет антигенсвязывающие свойства исходного нечеловеческого антитела, но которое обладает пониженной иммуногенностью по сравнению с исходным антителом при введении людям.

При использовании в настоящей заявке фраза "гибридное антитело" относится к антителу, в котором иммунореактивная область или сайт получен или происходит от первого вида, а константная область (которая может быть интактным, представлять собой часть константной области или модифицированную константную область в соответствии с настоящим изобретением) получена от второго вида. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, участок или сайт связывания мишени происходит из отличного от человека источника (например, мыши или примата), а константная область имеет человеческое происхождение.

Мультиспецифичные антитела согласно настоящему изобретению охватывают различные композиции и методики, включая асимметричные IgG-подобные антитела (например, triomab/quadroma, Trion Pharma/Fresenius Biotech); антитела по принципу "выступ во впадину" (Genentech); CrossMAb (Roche); электростатически сопряженные антитела (AMGEN); LUZ-Y (Genentech); белки на основе сконструированного домена с обменом цепей (SEEDBodies, EMD Serono; biologic, Merus); антитела с заменой Fab (Genmab), симметричные IgG-подобные антитела (например, Ig с двойным нацеливанием (DT) (GSK/Domantis); антитела "два в одном" (Genentech); перекрестно-сшитые MAb (Karmanos Cancer Center), mAb2 (F-star); Cov X-body (Cov X/Pfizer); белки слияния двойного переменного домена (DVD) и Ig (Abbott); IgG-подобные биспецифичные антитела (Eli Lilly); Ts2Ab (Medimmune/AZ); BsAb (ZymoGenetics); HERCULES (Biogen Idec, TvAb, Roche); белки слияния scFv/Fc; SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, ZymoGenetics/BMS); технологию переориентирования антитела с двойной аффинностью (Fc-DART), MacroGenics; (scFv)₂-Fab двойного действия (National Research Center for Antibody Medicine); белки слияния F(ab)₂ (Medarex/AMGEN); Fab двойного действия или Bis-Fab (Genentech); Dock-and-Lock (DNL, ImmunoMedics); Fab-Fv (UCB-Celltech); антитела на основе scFv и диател (например, биспецифичные рекрутеры Т-клеток (BiTEs, Micromet); тандемные диатела (Tandab, Affimed); DART (MacroGenics); одноцепочечные диатела; TCR-подобные антитела (AIT, Receptor Logics); белок слияния scFv сывороточного альбумина человека (Merrimack); COMBODIES (Epigen Biotech) и белки слияния IgG/не-IgG, например, иммуноцитокнины (EMDSerono, Philogen, ImmunGene, ImmunoMedics).

Термин "специфично связывается" или "имеет специфичность в отношении" в целом подразумевает, что антитело связывается с эпитопом с помощью своего антигенсвязывающего домена, и что указанное связывание предполагает некоторую комплементарность между антигенсвязывающим доменом и эпитопом. Согласно данному определению считается, что антитело "специфично связывается" с эпитопом, если оно связывается с указанным эпитопом через свой антигенсвязывающий домен легче, чем оно могло бы связываться со случайным неродственным эпитопом. Термин "специфичность" используется в настоящей заявке для определения относительной аффинности, с которой конкретное антитело связывается с конкретным эпитопом. Например, можно считать, что антитело "А" имеет более высокую специфичность в отношении данного эпитопа по сравнению с антителом "В", или можно считать, что антитело "А" связывается с эпитопом "С" с более высокой специфичностью по сравнению с его специфичностью в отношении родственного эпитопа "D". Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, антитело или фрагмент антитела "обладает специфичностью в отношении" антигена, если указанное антитело или фрагмент антитела образует комплекс с антигеном с константой диссоциации (K_d), составляющей 10^6 М или менее, 10^7 М или менее, 10^8 М или менее, 10^9 М или менее или 10^{10} М или менее.

При использовании в настоящей заявке фраза "гибридное антитело" относится к антителу, в котором иммунореактивная область или сайт получен или происходит от первого вида, а константная область (которая может быть интактной, представлять собой часть константной области или модифицированную константную область в соответствии с настоящим изобретением), получена от второго вида. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, участок или сайт связывания мишени происходит из источника нечеловеческого происхождения (например, из мыши или примата), а константный участок имеет человеческое происхождение.

Термин "антитело-антагонист" относится к антителу, которое связывается с мишенью и предотвращает или снижает ее биологический эффект. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, указанный термин может обозначать антитело, которое предотвращает осуществление биологической функции мишени, с которой оно связывается, например, TIGIT.

При использовании в настоящей заявке термин "антитело-антагонист против PD-1" относится к антителу, которое способно ингибировать биологическую активность PD-1 и/или последующее событие (события), опосредованное PD-1. Антитела-антагонисты против PD-1 включают антитела, которые блокируют, противодействуют, подавляют или снижают (в любой степени, в том числе значительной) биологическую активность PD-1, включая последующие события, опосредованные PD-1, такие как связывание PD-1 и последующая передача сигналов, ингибирование пролиферации Т-клеток, ингибирование активации Т-клеток, ингибирование секреции IFN, ингибирование секреции IL-2, ингибирование секреции TNF, индукция IL-10 и ингибирование противоопухолевых иммунных ответов. Следует четко понимать, что в целях настоящего изобретения термин "антитело-антагонист против PD-1" (используемый взаимозаменяемо с термином "антитело-антагонист PD-1", "антитело против PD-1-антагонист" или "антагонист-антитело против PD-1") включает все ранее определенные термины, названия, функциональные состояния и характеристики, посредством которых сам PD-1, его биологическая активность или последствия его биологической активности по существу устраняются, уменьшаются или нейтрализуются в любой значимой степени. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, антитело-антагонист против PD-1 связывается с PD-1 и усиливает противоопухолевый иммунный ответ.

При использовании в настоящей заявке термин "антитело-антагонист против PD-L1" относится к антителу, которое способно ингибировать биологическую активность PD-L1 и/или последующее событие (события), опосредованное PD-L1. Антитела-антагонисты против PD-L1 включают антитела, которые блокируют, противодействуют, подавляют или снижают (в любой степени, в том числе значительной) биологическую активность PD-L1, включая последующие события, опосредованные PD-L1, такие как связывание PD-L1 и последующая передача сигналов, ингибирование пролиферации Т-клеток, ингибирование активации Т-клеток, ингибирование секреции IFN, ингибирование секреции IL-2, ингибирование секреции TNF, индукция IL-10 и ингибирование противоопухолевых иммунных ответов. Следует четко понимать, что в целях настоящего изобретения термин "антитело-антагонист против PD-L1" (используемый взаимозаменяемо с термином "антитело-антагонист PD-L1", "антитело против PD-L1-антагонист" или "антагонист-антитело против PD-L1") включает все ранее определенные термины, названия, функциональные состояния и характеристики, посредством которых сам PD-L1, его биологическая активность или последствия его биологической активности по существу устраняются, уменьшаются или нейтрализуются в любой значимой степени. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, антитело-антагонист против PD-L1 связывается с PD-L1 и усиливает противоопухолевый иммунный ответ.

Фраза "регулятор иммунных контрольных точек" относится к функциональному классу агентов, которые ингибируют или стимулируют передачу сигналов через иммунную контрольную точку. "Регулятор иммунных контрольных точек" включает рецепторы и связанные с ними лиганды, которые вместе обеспечивают способы ингибирования или стимуляции сигнальных путей, приводящих в противном случае к активации Т-клеток. Примеры регуляторов иммунных контрольных точек включают, но не ограничиваются указанными, TIGIT и его лиганд CD155, PVR; PD-1 и его лиганды PD-L1 и PD-L2; CTLA-4 и его лиганды B7-1 и B7-2; TIM-3 и его лиганд галектин-9; LAG-3 и его лиганды, включая лектин синусоидальных эндотелиальных клеток печени (LSECtin) и галектин-3; CD122 и его лиганд CD122R; CD70, B7H3, аттенуатор В- и Т-лимфоцитов (BTLA) и VISTA.

Фразы "антагонист регулятора контрольных точек", "антагонист связывания иммунных контрольных точек" и "антагонист иммунных контрольных точек" используются в настоящей заявке взаимозаменяемо в отношении класса агентов, которые препятствуют активности (или ингибируют активность) регулятора иммунных контрольных точек таким образом, что в результате связывания с указанным регулятором контрольных точек или его лигандом передача сигналов через рецептор регулятора контрольных точек блокируется или ингибируется. Ингибирование этой передачи сигналов может приводить к обращению иммуносупрессии таким образом, что Т-клеточный иммунитет против раковых клеток может быть восстановлен или усилен. Антагонисты регуляторов иммунных контрольных точек включают фрагменты антител, пептидные ингибиторы, доминантно-негативные пептиды и низкомолекулярные лекарственные средства, представленные отдельно или как часть белка слияния или конъюгата.

Фразы "агонист связывания иммунных контрольных точек" и "агонист иммунных контрольных точек" используются в настоящей заявке взаимозаменяемо в отношении класса агентов, которые стимулируют активность регулятора иммунных контрольных точек таким образом, что в результате связывания с указанным регулятором контрольных точек или его лигандом стимулируется передача сигналов через рецептор регулятора контрольных точек. Стимуляция указанной передачи сигналов может приводить к восстановлению или усилению Т-клеточного иммунитета против раковых клеток. Примеры агонистов регуляторов иммунных контрольных точек включают, но не ограничиваются указанными, членов суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNF), таких как CD27, CD40, OX40 (CD 134), белок, родственный семейству глюкокортикоид-индуцированного TNFR (GITR), и 4-1BB (CD137) и их лиганды. Дополнительные агонисты регуляторов контрольных точек принадлежат суперсемейству B7-CD28, включая CD28 и ICOS.

Фразы "доминантно-негативный белок" или "доминантно-негативный пептид" относятся к белку

или пептиду, происходящему из белка дикого типа, который был генетически модифицирован в результате мутации и/или делеции таким образом, что модифицированный белок или пептид препятствует функции эндогенного белка дикого типа, из которого он происходит.

Фраза "низкомолекулярное лекарственное средство" относится к молекулярному соединению, часто органическому или металлоорганическому, которое не является полимером, обладает лекарственной активностью и имеет молекулярную массу менее чем примерно 2 кДа, менее чем примерно 1 кДа, менее чем примерно 900 Да, менее чем примерно 800 Да или менее чем примерно 700 Да. Термин включает большинство лекарственных соединений, называемых "лекарственными средствами", отличных от белка или нуклеиновых кислот, при этом небольшой пептид или аналог нуклеиновой кислоты можно рассматривать как низкомолекулярное лекарственное средство. Примеры включают химиотерапевтические противораковые препараты и ингибиторы ферментов. Низкомолекулярные лекарственные средства могут быть получены синтетическим, полусинтетическим путем (т.е. из природных предшественников) или биологическим путем.

Следует понимать, что при описании порядка расположения полипептидных доменов с дефисами между отдельными доменами (например, СН2-СН3) перечисленные домены расположены в порядке от аминоконца к карбокси-концу.

Фразы "специфично связывается" или "имеет специфичность в отношении" в целом подразумевают, что антитело связывается с эпитопом с помощью своего антигенсвязывающего домена и что указанное связывание предполагает некоторую комплементарность между антигенсвязывающим доменом и эпитопом. Согласно этому определению считается, что антитело "специфично связывается" с эпитопом, когда оно связывается с указанным эпитопом с помощью своего антигенсвязывающего домена легче, чем оно могло бы связываться со случайным неродственным эпитопом. Термин "специфичность" используется в настоящей заявке для определения относительной аффинности, с которой определенное антитело связывается с определенным эпитопом. Например, можно считать, что антитело "А" имеет более высокую специфичность в отношении данного эпитопа по сравнению с антителом "В", или можно считать, что антитело "А" связывается с эпитопом "С" с более высокой специфичностью по сравнению с его специфичностью в отношении родственного эпитопа "D".

Термин "иммуноконъюгат" относится к антителу, которое слито посредством ковалентной связи с ингибирующим пептидом или низкомолекулярным лекарственным средством. Пептид или низкомолекулярное лекарственное средство может быть связано с С-концом константной области тяжелой цепи или N-концом вариабельной области легкой и/или тяжелой цепи.

"Линкер" можно использовать для стабильного ковалентного связывания пептида или низкомолекулярного лекарственного средства, такого как майтанзиноид, с противоопухолевыми антагонистами. Линкеры могут быть чувствительными или по существу устойчивыми к кислотно-индуцированному расщеплению, индуцированному светом расщеплению, индуцированному пептидазой расщеплению, индуцированному эстеразой расщеплению и расщеплению дисульфидной связи в условиях, при которых указанное соединение или антитело остается активным. Подходящие линкеры хорошо известны в данной области техники и включают, например, дисульфидные группы, тиоэфирные группы, кислотолабильные группы, фотоллабильные группы, пептидаза-лабильные группы и эстераза-лабильные группы. Линкеры также включают заряженные линкеры и их гидрофильные формы, как описано в настоящей заявке и известно в данной области техники. Иммуноконъюгат может дополнительно содержать гибкий пептид из 3-15 аминокислот (или спейсер) между противоопухолевым антагонистом и пептидом и/или низкомолекулярным лекарственным средством.

При использовании в настоящей заявке термин "иммуноглобулиновый каркас" относится к любому полимеру аминокислот, который проявляет свойства, желаемые для поддержания функции антагониста, включая дополнительную специфичность антитела, усиление функции антитела или поддержание структуры и стабильности антитела. Иммуноглобулиновый каркас может содержать один или более константных областей иммуноглобулина, включая участки СН1, СН2 и/или СН3 из тяжелой цепи иммуноглобулина и/или участки СL из легкой цепи иммуноглобулина. К иммуноглобулиновому каркасу могут быть привиты связывающие домены полипептида-донора для придания указанному каркасу специфичности связывания полипептида-донора.

При использовании в настоящей заявке фраза "мультиспецифичный ингибитор" относится к молекуле, содержащей по меньшей мере два нацеливающих домена с разными специфичностями связывания. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, мультиспецифичный ингибитор представляет собой полипептид, содержащий каркас и два или более иммуноглобулиновых антигенсвязывающих домена, нацеленных на различные антигены или эпитопы. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, мультиспецифичный ингибитор представляет собой биспецифичное антитело.

При использовании в настоящей заявке термин "биспецифичная" относится к молекуле, содержащей по меньшей мере два нацеливающих домена с разными специфичностями связывания. Каждый нацеливающий домен способен специфично связываться с молекулой-мишенью и ингибировать биологическую функцию указанной молекулы-мишени при связывании с ней. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, биспецифичный антагонист регулятора контрольных точек представляет собой

полимерную молекулу, содержащую два или более пептидов. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, нацеливающий домен содержит антигенсвязывающий домен или CDR антитела. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, биспецифичный ингибитор представляет собой биспецифичное антитело.

Термины "биспецифичное антитело" и "биспецифичный антагонист" используются в настоящей заявке взаимозаменяемо по отношению к антителу, которое может специфично связываться с двумя разными антигенами (или эпитопами). Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, биспецифичное антитело представляет собой полноразмерное антитело, которое связывается с одним антигеном (или эпитопом) на одном из двух своих связывающих фрагментов (одна пара HC/LC) и связывается с другим антигеном (или эпитопом) на своем втором фрагменте (другая пара HC/LC). Согласно указанным вариантам реализации изобретения, биспецифичное антитело содержит два различных антигенсвязывающих фрагмента (как по специфичности, так и по CDR-последовательностям) и является моновалентным в отношении каждого антигена, с которым оно связывается.

Согласно другим вариантам реализации изобретения, биспецифичное антитело представляет собой полноразмерное антитело, которое может связываться с двумя различными антигенами (или эпитопами) в каждом из своих двух связывающих фрагментов (две пары HC/LC). Согласно указанным вариантам реализации изобретения, биспецифичное антитело содержит два идентичных антигенсвязывающих фрагмента, обладающих одинаковой специфичностью и одинаковыми последовательностями CDR, и является бивалентным в отношении каждого антигена, с которым оно связывается.

Примеры биспецифичных антител могут включать асимметричные IgG-подобные антитела (например, triomab/quadroma, Trion Pharma/Fresenius Biotech); антитела по типу "выступ во впадину" (Genentech); CrossMAb (Roche); электростатически сопряженные антитела (AMGEN); LUZ-Y (Genentech); белки на основе сконструированного домена с обменом цепей (SEEDBodies, EMD Serono; biologic, Merus); антитела с заменой Fab (Genmab), симметричные IgG-подобные антитела (например, Ig с двойным нацеливанием (DT) (GSK/Domantis); антитела "два в одном" (Genentech); перекрестно-сшитые MAb (Karmanos Cancer Center), mAb2 (F-star); Cov X-body (Cov X/Pfizer); белки слияния двойного переменного домена (DVD) и Ig (Abbott); IgG-подобные биспецифичные антитела (Eli Lilly); Ts2Ab (Medimmune/AZ); BsAb (ZymoGenetics); HERCULES (Biogen Idec, TvAb, Roche); белки слияния scFv/Fc; SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, ZymoGenetics/BMS); технологию ретаргетинга с двойной аффинностью (Fc-DART), MacroGenics; двойные (scFv)₂-Fab (National Research Center for Antibody Medicine); белки слияния F(ab)₂ (Medarex/AMGEN); Fab двойного действия или Bis-Fab (Genentech); Dock-and-Lock (DNL, ImmunoMedics); Fab-Fv (UCB-Celltech); антитела на основе scFv и диатела (например, биспецифичные рекрутеры Т-клеток (BiTEs, Micromet); тандемные диатела (Tandab, Affimed); DART (MacroGenics); одноцепочечные диатела; TCR-подобные антитела (AIT, Receptor Logics); белок слияния scFv сывороточного альбумина человека (Merrimack); COMBODIES (Epigen Biotech) и белки слияния IgG/he-IgG (например, иммуноцитокнины (EMDSerono, Philogen, ImmunGene, ImmunoMedics).

Термины "лечить" и "лечение" относятся к облегчению одного или более симптомов, связанных с клеточным пролиферативным расстройством, предотвращению или отсрочке появления одного или более симптомов клеточного пролиферативного расстройства и/или уменьшению степени тяжести или частоты проявления одного или более симптомов клеточного пролиферативного расстройства.

Фразы "нуждающийся в этом пациент", "пациент, нуждающийся в лечении", или "субъект, нуждающийся в лечении", включают субъектов, таких как субъекты, представляющие собой млекопитающих, которые будут иметь благоприятный эффект от введения противоопухолевого антагониста согласно настоящему изобретению для лечения клеточного пролиферативного расстройства.

Термины "терапевтически эффективное количество", "фармакологически эффективное количество" и "физиологически эффективное количество" используются взаимозаменяемо для обозначения количества противоопухолевого антагониста, которое необходимо для обеспечения порогового уровня активных агентов-антагонистов в кровотоке или в ткани-мишени. Точное количество будет зависеть от множества факторов, например, конкретного активного агента, компонентов и физических характеристик композиции, предполагаемой популяции пациентов, проблем данного пациента и т.п., и может быть легко определено специалистом в данной области техники на основе информации, представленной в настоящей заявке или иным образом доступной в соответствующей литературе.

Термины "улучшить", "увеличить" или "уменьшить", используемые в контексте настоящей заявки, указывают на значения или параметры относительно базового измерения, такого как измерение у того же субъекта до начала лечения, описанного в настоящей заявке, или измерение у контрольного субъекта (или нескольких контрольных субъектов), не получающего лечения, описанного в настоящей заявке.

"Контрольный субъект" представляет собой субъекта, страдающего тем же клеточным пролиферативным расстройством, что и субъект, которому проводят лечение, имеющего примерно такой же возраст, что и субъект, которому проводят лечение (для того, чтобы убедиться, что стадии заболевания у субъекта, которому проводят лечение, и контрольных субъектах сопоставимы). Индивид, которого лечат (также называемый "пациентом" или "субъектом") может представлять собой плод, младенца, ребенка, подростка или взрослого человека, страдающего клеточным пролиферативным расстройством.

Термин "клеточное пролиферативное расстройство" относится к расстройству, характеризующемуся аномальной пролиферацией клеток, пролиферативное расстройство не подразумевает каких-либо ограничений в отношении скорости роста клеток, а только указывает на потерю нормального контроля, который влияет на рост и деление клеток. Таким образом, согласно некоторым вариантам реализации изобретения, при клеточном пролиферативном расстройстве клетки могут делиться с такой же скоростью, как нормальные клетки, но не реагировать на сигналы, ограничивающие такой рост. Термин "клеточное пролиферативное расстройство" включает новообразование, рак или опухоль.

Термин "рак" или "опухоль" относится к любому из различных злокачественных новообразований, характеризующихся пролиферацией клеток, которые обладают способностью инвазировать окружающие ткани и/или метастазировать в новые сайты колонизации, и включает лейкоз, лимфому, карциному, меланому, саркому, эмбрионально-клеточную опухоль и бластому. Примеры рака для лечения с помощью способов согласно настоящему изобретению включают рак мозга, рак мочевого пузыря, рак груди, рак шейки матки, рак толстой кишки, рак головы и шеи, рак почки, рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, мезотелиому, рак яичников, рак предстательной железы, рак желудка и рак матки, лейкоз и медуллобластому.

Термин "лейкоз" относится к прогрессирующему злокачественному заболеванию органов кроветворения и в целом характеризуется измененной пролиферацией и развитием лейкоцитов и их предшественников в крови и костном мозге. Примеры лейкозов включают, например, острый нелимфоцитарный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, острый гранулоцитарный лейкоз, хронический гранулоцитарный лейкоз, острый промиелоцитарный лейкоз, Т-клеточный лейкоз взрослых, алейкемический лейкоз, лейкоцитемический лейкоз, базофильный лейкоз, лейкоз бластных клеток, лейкоз крупного рогатого скота, хронический миелоцитарный лейкоз, лейкоз кожи, эмбриональный лейкоз, эозинофильный лейкоз, лейкоз Гросса, волосистоклеточный лейкоз, гемобластный лейкоз, гемоцитобластный лейкоз, гистиоцитарный лейкоз, лейкоз стволовых клеток, острый моноцитарный лейкоз, лейкопенический лейкоз, лимфатический лейкоз, лимфобластный лейкоз, лимфоцитарный лейкоз, лимфогенный лейкоз, лимфоидный лейкоз, лимфосаркомный лейкоз, лейкоз тучных клеток, мегакариоцитарный лейкоз, микромиелобластный лейкоз, моноцитарный лейкоз, миелобластный лейкоз, миелоцитарный лейкоз, миелоидный гранулоцитарный лейкоз, миеломоноцитарный лейкоз, лейкоз Негели, лейкоз плазматических клеток, плазмоцитарный лейкоз, промиелоцитарный лейкоз, лейкоз клеток Ридера, лейкоз Шиллинга, лейкоз стволовых клеток, сублейкемический лейкоз и лейкоз недифференцированных клеток.

Термин "карцинома" относится к злокачественному росту эпителиальных клеток, имеющих тенденцию инфильтрировать окружающие ткани и давать начало метастазам. Примеры карцином включают, например, ацинарноклеточную карциному, аденокарциному, аденокистозную карциному, аденоиднокистозную карциному, аденоматозную карциному, карциному коры надпочечников, альвеолярную карциному, альвеолярно-клеточную карциному, базально-клеточную карциному, базоцеллюлярную карциному, базалоидную карциному, базоспиноцеллюлярную карциному, бронхоальвеолярную карциному, бронхиальную карциному, бронхогенную карциному, церебриформную карциному, холангиоцеллюлярную карциному, хорионическую карциному, слизеобразующую карциному, карциному комедонного типа, рак тела матки, криброзную карциному, распространенную карциному плевры, карциному кожи, цилиндрическую карциному, карциному цилиндрических клеток, карциному протока, твердую карциному, эмбриональную карциному, энцефалоидную карциному, эпинеоидную карциному, эпителиальную аденоидную карциному, экзофитную карциному, карциному из язвы, фиброзную карциному, желатиновую карциному, коллоидную карциному, гигантоклеточную карциному, гигантоклеточный рак, железистый рак, гранулезно-клеточную карциному, базально-клеточную карциному, гематоидную карциному, гепатоклеточную карциному, карциному из клеток Хуртла, гиалиновую карциному, гипемефроидную карциному, инфантильную эмбриональную карциному, карциному *in situ*, внутриэпидермальную карциному, интраэпителиальную карциному, карциному Кромпечера, карциному из клеток Кульчицкого, крупноклеточную карциному, лентиккулярную карциному, линзовидную карциному, липоматозную карциному, лимфоэпителиальную карциному, медулярную карциному, мозговидную карциному, меланотическую карциному, карциному Молле, муцинозную карциному, мукоидную карциному, карциному из слизистых клеток, мукоэпидермоидную карциному, карциному слизистой оболочки, слизеобразующую карциному, миксоматодную карциному, носоглоточную карциному, овсяноклеточную карциному, оссифицирующую карциному, остеоидную карциному, папиллярную карциному, перипортальную карциному, преинвазивную карциному, карциному шиповидных клеток, почечно-клеточную карциному почки, карцинома резервных клеток, саркомоподобную карциному, карциному Шнейдера, карциному мошонки, перстневидно-клеточную карциному, простую карциному, мелкоклеточную карциному, соланоидную карциному, карциному из сферических клеток, веретенклеточную карциному, губчатую карциному, плоскоклеточную карциному, сквамозно-клеточную карциному, струнную карциному, телеангиэктатическую карциному, карциному из гладких мышечных волокон и сосудистой ткани, переходноклеточную карциному, туберозную карциному, туберозный рак, бородавчатую карциному и ворсинчатую карциному.

Термин "саркома" относится к опухоли, состоящей из вещества, подобного эмбриональной соеди-

нительной ткани, которая в целом состоит из плотно упакованных клеток, заключенных в фибриллярное или гомогенное вещество. Примеры сарком включают, например, хондросаркому, фибросаркому, лимфосаркому, меланосаркому, миксосаркому, остеосаркому, саркому Абемети, саркому жировой ткани, липосаркому, альвеолярную саркому мягких тканей, амелобластную саркому, ботриоидную саркому, гранулоцитарную саркому, хориокарциному, эмбриональную саркому, саркому Вильмса, саркому эндометрия, стромальную саркому, саркому Юинга, фасциальную саркому, фибробластную саркому, гигантоклеточную саркому, гранулоцитарную саркому, ходжкинскую саркому, идиопатическую множественную пигментную геморрагическую саркому, например, иммунобластную саркому В-клеток, лимфомы (например, неходжкинскую лимфому), иммунобластную саркому Т-клеток, саркому Дженсена, саркому Капоши, саркому из клеток Купфера, ангиосаркому, лейкосаркому, злокачественную мезенхимому, паростальную саркому, ретикулоцитарную саркому, саркому Рауса, листовидную цитосаркому, синовиальную саркому и телеангиэктатическую саркому.

Термин "меланома" относится к опухоли, возникающей из меланоцитарной системы кожи и других органов. Меланомы включают, например, акрально-лентигинозную меланому, амеланотическую меланому, доброкачественную ювенильную меланому, меланому Клаудмана, меланому S91, меланому Хардинга-Пасси, ювенильную меланому, меланому типа злокачественного лентигино, злокачественную меланому, нодулярную меланому, подногтевую меланому и поверхностную распространяющуюся меланому.

Дополнительные раковые заболевания включают, например, ходжкинскую болезнь, множественную миелому, нейробластому, рак молочной железы, рак яичников, рак легкого, рабдомиосаркому, первичный тромбоцитоз, первичную макроглобулинемию, мелкоклеточные опухоли легкого, первичные опухоли мозга, рак желудка, рак толстой кишки, злокачественную инсулому поджелудочной железы, злокачественный карциноид, предраковые поражения кожи, рак яичек, рак щитовидной железы, нейробластому, рак пищевода, рак мочеполовых путей, злокачественную гиперкальциемию, рак шейки матки, рак эндометрия и рак надпочечников.

I. Антагонисты регуляторов контрольных точек

Согласно одному аспекту, настоящее изобретение обеспечивает противоопухолевый антагонист, содержащий иммуноглобулиновый каркас с (1) парой фрагментов, содержащих участки вариабельного домена, которые специфично связываются с первым регулятором иммунных контрольных точек, и (2) одноцепочечным фрагментом (scFv), который специфично связывается со вторым регулятором иммунных контрольных точек.

Согласно другому аспекту, настоящее изобретение обеспечивает противоопухолевый антагонист, содержащий иммуноглобулиновый каркас, структурно связанный с первым антагонистом регуляторов иммунных контрольных точек и вторым антагонистом регуляторов иммунных контрольных точек в форме scFv.

Согласно обоим аспектам, иммуноглобулиновый каркас может содержать один или более константных областей иммуноглобулина, например, CH1, CH2 и/или CH3 IgG. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, иммуноглобулиновый каркас представляет собой Fc-фрагмент (шарнир-CH2-CH3).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, противоопухолевый антагонист содержит иммуноглобулиновый каркас, в котором N-конец указанного антагониста содержит первый антагонист регуляторов иммунных контрольных точек, структурно с ним связанный, где указанный первый антагонист регуляторов иммунных контрольных точек специфично связывается с PD-1, PD-L1, LAG-3, TIGIT, а второй антагонист регуляторов иммунных контрольных точек расположен на C-конце указанного антагониста в виде scFv, который специфично связывается с PD-1, PD-L1, LAG-3 или TIGIT.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, scFv содержит линкер, соединяющий вариабельные области тяжелой цепи с вариабельными областями легкой цепи. Согласно одному варианту реализации изобретения, линкер содержит аминокислотную последовательность, содержащую между 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 копиями аминокислотной последовательности G4S. Согласно другому варианту реализации изобретения, линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в любой из последовательностей SEQ ID NO: 188-191. Согласно более конкретному варианту реализации изобретения, линкер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 191.

Согласно одному варианту реализации изобретения, scFv против TIGIT содержит один или более CDR тяжелой цепи, выбранных из SEQ ID NO: 1-25, и один или более CDR легкой цепи, выбранных из SEQ ID NO: 26-47.

Согласно другому варианту реализации изобретения, scFv против TIGIT содержит вариабельные области тяжелой цепи/легкой цепи, где указанный scFv содержит вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), которая имеет по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64 и 66, и вариабельную область легкой цепи (LCVR), которая имеет по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичности с LCVR, которая имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63 и 67.

Согласно более конкретному варианту реализации изобретения, scFv против TIGIT содержит HCVR, которая имеет по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 66, и LCVR, которая имеет по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичности с LCVR, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67.

Согласно другому варианту реализации изобретения, scFv против TIGIT содержит: HCVR, который содержит (1) HCDR1 с последовательностью SEQ ID NO: 23, HCDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 24 и HCDR 3 с последовательностью SEQ ID NO:25 в комбинации с (2) HFR1, который имеет по меньшей мере 80%, 85% или 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 260, HFR2, который имеет по меньшей мере 80%, 85% или 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:247, HFR3, который имеет по меньшей мере 80%, 85% или 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 261, и HFR4, который имеет по меньшей мере 80%, 85% или 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 236; и дополнительно содержит LCVR иммуноглобулина, которая содержит (1) LCDR1 с последовательностью SEQ ID NO: 45, LCDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 46 и LCDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 47 в комбинации с (2) LFR1, который имеет по меньшей мере 80%, 85% или 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 220, LFR2, который имеет по меньшей мере 80%, 85% или 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 228, LFR3, который имеет по меньшей мере 80%, 85% или 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 234, LFR4, который имеет по меньшей мере 80%, 85% или 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 262.

Согласно другому варианту реализации изобретения, первый нацеливающий домен содержит один или более переменных областей из антитела против PD-1, и второй нацеливающий домен содержит scFv против TIGIT, как описано выше.

Согласно одному варианту реализации изобретения, нацеливающий домен против PD-1 содержит один или более CDR тяжелой цепи, выбранных из последовательностей SEQ ID NO: 68-81, и/или один или более CDR легкой цепи, выбранных из последовательностей SEQ ID NO: 82-95.

Согласно другому варианту реализации изобретения, нацеливающий домен против PD-1 содержит: HCVR, которая имеет по меньшей мере 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 96, 98, 100, 102, 104 и 106; LCVR, которая имеет по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичности с LCVR, которая имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 97, 99, 101, 103, 105 и 107; или и то и другое.

Согласно другому варианту реализации изобретения, нацеливающий домен против PD-1 содержит: HCVR, которая содержит (1) HCDR1 с последовательностью SEQ ID NO:79, HCDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 80 и HCDR 3 с последовательностью SEQ ID NO: 81 в комбинации с (2) HFR1, который имеет по меньшей мере 80%, 85% или 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 283, HFR2, который имеет по меньшей мере 80%, 85% или 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 277, HFR3, который имеет по меньшей мере 80%, 85% или 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 288, HFR4, который имеет по меньшей мере 80%, 85% или 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 274; LCVR иммуноглобулина, которая содержит (1) LCDR1 с последовательностью SEQ ID NO: 93, LCDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 94 и LCDR 3 с последовательностью SEQ ID NO: 95 в комбинации с (2) LFR1, который имеет по меньшей мере 80%, 85% или 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 289, LFR2, который имеет по меньшей мере 80%, 85% или 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 290, LFR3, который имеет по меньшей мере 80%, 85% или 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 291, и LFR4, который имеет по меньшей мере 80%, 85% или 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 292; или и то и другое.

Согласно другому варианту реализации изобретения, нацеливающий домен против PD-1 содержит HCVR, которая имеет по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 106; LCVR, которая имеет по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 107; или обе из указанных областей.

Согласно конкретному варианту реализации изобретения, биспецифичный антагонист PD-1/TIGIT содержит первый нацеливающий домен, который содержит HCVR, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106, и/или LCVR, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107, в комбинации с scFv против TIGIT, который содержит HCVR, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, и LCVR, которая имеет аминокислотную последовательность

ность SEQ ID NO: 67.

Согласно более конкретному варианту реализации изобретения, scFv биспецифичного антагониста PD-1/TIGIT содержит линкер, соединяющий переменные области тяжелой цепи с переменными областями легкой цепи во втором нацеливающем домене, где указанный линкер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 191.

Согласно другому варианту реализации изобретения, биспецифичный антагонист PD-1/TIGIT содержит: тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 160; легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 161; или обе из указанных цепей.

Согласно другому варианту реализации изобретения, биспецифичный антагонист PD-1/TIGIT содержит: тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 162; легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 161; или обе из указанных цепей.

Согласно другому варианту реализации изобретения, биспецифичный антагонист PD-1/TIGIT содержит тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 160, и легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 161.

Согласно другому варианту реализации изобретения, первый нацеливающий домен содержит один или более переменных областей из антитела против PD-L1, и второй нацеливающий домен содержит scFv против TIGIT, как описано выше.

Согласно одному варианту реализации изобретения, нацеливающий домен против PD-L1 содержит один или более CDR тяжелой цепи, выбранных из последовательностей SEQ ID NO: 108-122, и/или один или более CDR легкой цепи, выбранных из последовательностей SEQ ID NO: 123-138.

Согласно другому варианту реализации изобретения, нацеливающий домен против PD-L1 содержит HCVR, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% идентичный аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151 и 153, и/или LCVR, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% идентичный аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 140, 142, 144, 146, 148, 152 и 154.

Согласно другому варианту реализации изобретения, нацеливающий домен против PD-L1 содержит HCVR, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% идентичный аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 153, и/или LCDR, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% идентичный LCVR, содержащему аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 154.

Согласно другому варианту реализации изобретения, нацеливающий домен против PD-L1 содержит: HCVR иммуноглобулина, которая содержит (1) HCDR1 с последовательностью SEQ ID NO: 111, HCDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 114 и HCDR 3 с последовательностью SEQ ID NO: 115 в комбинации с (2) HFR1, по меньшей мере на 80%, 85% или 90% идентичным аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 283, HFR2, по меньшей мере на 80%, 85% или 90% идентичным аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 277, HFR3, по меньшей мере на 80%, 85% или 90% идентичным аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 300, и HFR4, по меньшей мере на 80%, 85% или 90% идентичным аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 274; LCVR иммуноглобулина, которая содержит (1) LCDR1 с последовательностью SEQ ID NO: 123, LCDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 124 и LCDR 3 с последовательностью SEQ ID NO: 125 в комбинации с (2) LFR1, по меньшей мере на 80%, 85% или 90% идентичным аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 294, LFR2, по меньшей мере на 80%, 85% или 90% идентичным аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 295, LFR3, по меньшей мере на 80%, 85% или 90% идентичным аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 296, и LFR4, по меньшей мере на 80%, 85% или 90% идентичным аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 276; или и то и другое.

Согласно конкретному варианту реализации изобретения, биспецифичный антагонист PD-L1/TIGIT содержит первый нацеливающий домен, который содержит: HCVR, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 153, и/или LCVR, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 154, в комбинации со вторым нацеливающим доменом в виде scFv против TIGIT, который содержит HCVR, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, и LCVR, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67. Согласно более конкретному варианту реализации изобретения, scFv в биспецифичном антагонисте против PD-L1/TIGIT содержит линкер, соединяющий HCVR против TIGIT с LCVR против TIGIT во втором нацеливающем домене, где указанный линкер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 191.

Согласно другому варианту реализации изобретения, первый нацеливающий домен содержит один или более переменных областей из антитела против LAG-3, и второй нацеливающий домен содержит

scFv против TIGIT, как описано выше.

Согласно одному варианту реализации изобретения, нацеливающий домен против LAG-3 содержит один или более CDR тяжелой цепи иммуноглобулина, выбранных из SEQ ID NO: 163-171, и/или один или более CDR легкой цепи иммуноглобулина, выбранных из SEQ ID NO: 172-178.

Согласно другому варианту реализации изобретения, нацеливающий домен против LAG-3 содержит HCVR, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% идентичный аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 180, 182, 184 и 186, и/или LCVR, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% идентичный LCVR, содержащему аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 181, 183, 185 и 187.

Согласно другому варианту реализации изобретения, нацеливающий домен против LAG-3 содержит: HCVR иммуноглобулина, содержащую (1) HCDR1 с последовательностью SEQ ID NO: 163, HCDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 164 и HCDR 3 с последовательностью SEQ ID NO: 165 в комбинации с (2) HFR1, по меньшей мере на 80%, 85% или 90% идентичным аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 316, HFR2, по меньшей мере на 80%, 85% или 90% идентичным аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 317, HFR3, по меньшей мере на 80%, 85% или 90% идентичным аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 318, и HFR4, по меньшей мере на 80%, 85% или 90% идентичным аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 319; LCVR иммуноглобулина, содержащую (1) LCDR1 с последовательностью SEQ ID NO: 172, LCDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 173 и LCDR 3 с последовательностью SEQ ID NO: 174 в комбинации с (2) LFR1, по меньшей мере на 80%, 85% или 90% идентичным аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 320, LFR2, по меньшей мере на 80%, 85% или 90% идентичным аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 321, LFR3, по меньшей мере на 80%, 85% или 90% идентичным аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 322, и LFR4, по меньшей мере на 80%, 85% или 90% идентичным аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 323; или и то, и другое.

Согласно другому варианту реализации изобретения, нацеливающий домен против LAG-3 содержит HCVR иммуноглобулина, которая имеет аминокислотную последовательность, которая на 90%, 95%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 180, и/или LCVR иммуноглобулина, которая имеет аминокислотную последовательность, которая на 90%, 95%, 99%, или 100% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 181.

Согласно конкретному варианту реализации изобретения, биспецифичный антагонист LAG-3/TIGIT содержит первый нацеливающий домен, который содержит HCVR, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 180, и/или LCVR, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 181, в комбинации с scFv против TIGIT, содержащим HCVR, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, и LCVR, содержащий последовательность SEQ ID NO: 67. Согласно более конкретному варианту реализации изобретения, scFv в биспецифичном антагонисте против LAG-3/TIGIT содержит линкер, соединяющий HCVR против TIGIT с LCVR против TIGIT во втором нацеливающем домене, где указанный линкер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 189 или SEQ ID NO: 191.

Согласно одному варианту реализации изобретения, биспецифичный антагонист LAG-3/TIGIT содержит тяжелую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 192 или 193; легкую цепь иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 181, или обе из указанных цепей.

Антитела против LAG-3 и их антигенсвязывающие фрагменты

Согласно другому аспекту, настоящее изобретение обеспечивает антитела, включая их антигенсвязывающие части, которые специфично связываются с LAG-3. На фиг. 19A показаны последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, соответствующие mAb против LAG-3 2L2A.1, 2L2A.6, 2L27B и 3L1A. На фиг. 19B показаны последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, соответствующие mAb против LAG-3 2L2A.1, 2L2A.6, 2L27B и 3L1A. На фиг. 20 показаны последовательности VH и VL mAb против LAG-3 2L2A.1, 2L2A.6, 2L27B и 3L1A.

Согласно одному варианту реализации изобретения, антитело против LAG-3 или его антигенсвязывающая часть содержит: последовательность CDR1 тяжелой цепи иммуноглобулина (HCDR1), по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85% или по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности HCDR1, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 163, 166 и 169; последовательность CDR2 тяжелой цепи иммуноглобулина (HCDR2), по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85% или по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности HCDR2, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 164, 167 и 170; CDR3 тяжелой цепи иммуноглобулина (HCDR3), по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85% или по меньшей мере на 90% идентичный по аминокислотной последовательности HCDR3, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 165, 168 и 171; CDR1 легкой цепи иммуноглобулина (LCDR1) по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85% или по меньшей мере на 90% идентичный по аминокислотной последовательности LCDR1, выбран-

ной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 172, 175 и 177; CDR2 легкой цепи иммуноглобулина (LCDR2), по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85% или по меньшей мере на 90% идентичный аминокислотной последовательности LCDR2, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 173 и 178; и CDR3 легкой цепи иммуноглобулина (LCDR3) по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85% или по меньшей мере на 90% идентичный аминокислотной последовательности LCDR3, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 174, 176 и 179.

Согласно другому варианту реализации изобретения, антитело против LAG-3 или его антигенсвязывающая часть содержит: аминокислотную последовательность HCDR1 иммуноглобулина, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 163, 166 и 169; аминокислотную последовательность HCDR2 иммуноглобулина, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 164, 167 и 170; аминокислотную последовательность HCDR3 иммуноглобулина, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 165, 168 и 171; аминокислотную последовательность LCDR1 иммуноглобулина, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 172, 175 и 177; аминокислотную последовательность LCDR2 иммуноглобулина, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 173 и 178; и аминокислотную последовательность LCDR3 иммуноглобулина, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 174, 176 и 179.

Согласно другому варианту реализации изобретения, антитело против LAG-3 или его антигенсвязывающая часть содержит: HCVR иммуноглобулина, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 180, 182, 184 и 186; LCVR иммуноглобулина, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности с LCVR, которая имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 181, 183, 185 и 187; или и то, и другое.

Согласно другому варианту реализации изобретения, антитело против LAG-3 или его антигенсвязывающая часть содержит: HCVR иммуноглобулина, которая имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 180, 182, 184 и 186; LCVR иммуноглобулина, которая имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 181, 183, 185 и 187; или и то, и другое.

Согласно другому варианту реализации изобретения, антитело против LAG-3 или его антигенсвязывающая часть содержит: последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 180; последовательность легкой цепи иммуноглобулина, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 181; или обе из указанных последовательностей.

Согласно более конкретному варианту реализации изобретения, антитело против LAG-3 или его антигенсвязывающая часть содержит: последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 180; последовательность легкой цепи иммуноглобулина SEQ ID NO: 181; или обе из указанных последовательностей.

Согласно другому аспекту, настоящее изобретение обеспечивает одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих любое антитело против LAG-3 или его любую антигенсвязывающую часть, как описано в настоящей заявке.

Согласно другому аспекту, настоящее изобретение обеспечивает один или более векторов экспрессии, содержащих одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих любое антитело против LAG-3 или его любую антигенсвязывающую часть, как описано в настоящей заявке.

Согласно другому аспекту, настоящее изобретение обеспечивает клетку-хозяин, трансформированную одной или более нуклеиновыми кислотами или одним или более векторами экспрессии, кодирующими любое антитело против LAG-3 или любую антигенсвязывающую часть, как описано в настоящей заявке.

Согласно другому аспекту, настоящее изобретение обеспечивает биспецифичный противоопухолевый антагонист, содержащий первый нацеливающий домен, специфично связывающийся с LAG-3; и второй нацеливающий домен, специфично связывающийся с PD-1, PD-L1 или TIGIT, где указанный первый нацеливающий домен содержит любые из описанных выше связывающихся с LAG-3 частей. Предпочтительно, биспецифичный противоопухолевый антагонист LAG-3 содержит иммуноглобулиновый каркас, содержащий один или более константных областей IgG, например, CH1, CH2, CH3 и/или CL.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, первый нацеливающий домен расположен на N-конце, а второй нацеливающий домен расположен на C-конце. Согласно другим вариантам реализации изобретения, первый нацеливающий домен расположен на C-конце, а второй нацеливающий домен расположен на N-конце. Согласно другим вариантам реализации изобретения, второй нацеливающий домен встроен в петлевой участок, например, домена CH3.

Согласно одному варианту реализации изобретения, биспецифичный противоопухолевый антагонист содержит первый нацеливающий домен, специфично связывающийся с LAG-3, и второй нацеливающий домен, специфично связывающийся с PD-1, где указанный первый нацеливающий домен содержит любой из связывающихся с LAG-3 фрагментов, описанных выше, и указанный второй нацеливаю-

ший домен содержит любой их связывающихся с PD-1 фрагментов, описанных ниже. Например, согласно одному варианту реализации изобретения, первый нацеливающий домен содержит аминокислотную последовательность HCVR SEQ ID NO: 180 в комбинации с LCVR, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 181, и второй нацеливающий домен содержит HCVR, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106, в комбинации с LCVR, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107. Альтернативно, второй домен может быть представлен в форме PD-1 ECD.

Согласно другому варианту реализации изобретения, биспецифичный противоопухолевый антагонист содержит первый нацеливающий домен, специфично связывающийся с LAG-3, и второй нацеливающий домен, специфично связывающийся с PD-L1, где указанный первый нацеливающий домен содержит любой из связывающихся с LAG-3 фрагментов, описанных выше, и где указанный второй нацеливающий домен содержит любой из связывающихся с PD-L1 фрагментов, описанных ниже. Например, согласно одному варианту реализации изобретения, первый нацеливающий домен содержит HCVR, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 180, в комбинации с LCVR, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 181, и второй нацеливающий домен содержит HCVR, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 153, в комбинации с LCVR, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 154.

Согласно другому варианту реализации изобретения, биспецифичный противоопухолевый антагонист содержит первый нацеливающий домен, специфично связывающийся с LAG-3, и второй нацеливающий домен, специфично связывающийся с TIGIT, где указанный первый нацеливающий домен содержит любой из связывающихся с LAG-3 фрагментов, описанных выше, и указанный второй нацеливающий домен содержит любой из связывающихся с TIGIT фрагментов, описанных ниже. Например, согласно одному варианту реализации изобретения, первый нацеливающий домен содержит HCVR, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 180, в комбинации с LCVR, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 181, и второй нацеливающий домен содержит HCVR, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, в комбинации с LCVR, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67. Альтернативно, второй домен может быть представлен в форме TIGIT ECD.

Примеры иммуноглобулиновых каркасов включают, например, полноразмерный сегмент CH1-CH2-CH3, как приведено в последовательностях SEQ ID NO: 155-157 и 205-215, или Fc-фрагмент (шарнир-CH2-CH3), содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в любой из последовательностей SEQ ID NO: 195-202.

Антитело против TIGIT и фрагменты антитела против TIGIT

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, антагонист регуляторов контрольных точек включает антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент (фрагменты). На фиг. 1 показаны последовательности CDR mAb против TIGIT, тогда как на фиг. 2A-2B показаны несколько вариантов реализации последовательностей переменного домена антитела против TIGIT для применения согласно настоящему изобретению.

Согласно одному варианту реализации изобретения, антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент (фрагменты) содержит: (1) HCVR иммуноглобулина, содержащую три определяющих комплементарность участка (HCDR): HCDR1, HCDR2 и HCDR3, где HCDR1 имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 6, 11, 15, 17, 20 и 23, где HCDR2 имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 4, 7, 9, 12, 13, 16, 18, 21 и 24, и где HCDR3 имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, 5, 8, 10, 14, 19, 22 и 25; и (2) LCVR иммуноглобулина, содержащую последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где LCDR1 имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26, 29, 31, 33, 35, 39, 42 и 45, где LCDR2 имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 27, 30, 36, 37, 40, 43 и 46, и где LCDR3 имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28, 32, 34, 38, 41, 44 и 47; где указанное антитело или его антигенсвязывающая часть специфично связывается с TIGIT человека. Согласно другому варианту реализации изо-

бретения, антитело против TIGIT или его антигенсвязывающий фрагмент (фрагменты) содержит: (1) HCVR иммуноглобулина, которая имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64 и 66; и (2) LCVR иммуноглобулина, которая имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65 и 67; где указанное антитело или его антигенсвязывающая часть специфично связывается с TIGIT человека.

Антитела против PD-1 и их антигенсвязывающие фрагменты

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, антагонист регуляторов контрольных точек включает антитело против PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент (фрагменты). На фиг. 3 показаны последовательности CDR mAb против PD-1, и на фиг. 4A-4C показаны несколько вариантов реализации последовательностей варибельного домена антитела против PD-1 для применения согласно настоящему изобретению.

Согласно одному варианту реализации изобретения, антитело против PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент (фрагменты) содержит: (1) HCVR иммуноглобулина, содержащую последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, где HCDR1 имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 68, 71, 74, 76 и 79, где HCDR2 имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 69, 72, 77 и 80, и где HCDR3 имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 70, 73, 75, 78 и 81; и (2) LCVR иммуноглобулина, содержащую последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где LCDR1 имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 82, 85, 88, 89, 90 и 93, где LCDR2 имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 83, 86, 91 и 94, и где LCDR3 имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, на 85%, на 90%, на 95%, на 99% или на 100% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 84, 87, 92, и 95, где указанное антитело или его антигенсвязывающая часть специфично связывается с PD-1 человека.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, антитело против PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент (фрагменты) содержит: (1) HCVR иммуноглобулина, которая имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 96, 98, 100, 102, 104 и 106; и (2) LCVR иммуноглобулина, которая имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 97, 99, 101, 103, 105 и 107, где указанное антитело, или его антигенсвязывающая часть специфично связывается с PD-1 человека.

Антитела против PD-L1 и их антигенсвязывающий фрагмент

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, антагонист регуляторов контрольных точек включает антитело против PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент (фрагменты). На фиг. 5 показаны последовательности CDR mAb против PD-L1, и на фиг. 6A-6C показаны несколько вариантов реализации последовательностей варибельного домена антитела против PD-L1 для применения согласно настоящему изобретению.

Согласно одному варианту реализации изобретения, антитело против PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент (фрагменты) содержит: (1) HCVR иммуноглобулина, содержащий последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3, где HCDR1 имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 108, 111, 117 и 120, где HCDR2 имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 109, 112, 114, 116, 118 и 121, где HCDR3 имеет аминокислотную последователь-

ность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 110, 113, 115, 119 и 122; и (2) LCVR иммуноглобулина, где переменная область легкой цепи содержит три определяющих комплементарности участка (LCDR): LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где LCDR1 имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 123, 126, 130, 133 и 136, где LCDR2 имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 124, 127, 131, 134 и 137, и где LCDR3 имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 125, 128, 129, 132, 135 и 138, где указанное антитело или его антигенсвязывающая часть специфично связывается с PD-L1 человека.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, антитело против PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент (фрагменты) содержит: (1) HCVR иммуноглобулина, которая имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151 и 153; и (2) LCVR иммуноглобулина, которая имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152 и 154, где указанное антитело или его антигенсвязывающая часть специфично связывается с PD-L1 человека.

II. Прочие варианты реализации

HCVR и LCVR, описанные в настоящей заявке, могут быть связаны с иммуноглобулиновым каркасом. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, иммуноглобулиновый каркас представлен в форме IgG1, IgG2 или IgG4. Иммуноглобулиновый каркас может содержать участки CH1-CH2-CH3 или может содержать встречающийся в природе Fc-фрагмент или не встречающийся в природе или мутированный Fc-фрагмент, например, не обладающий эффекторной функцией или в основном не обладающий эффекторной функцией Fc-фрагмент (например, IgG2 или IgG4 человека) или, альтернативно, Fc, обладающий усиленным связыванием с одним или более активирующими Fc-рецепторами (FcγRI, FcγRIIa или FcγRIIIa) для усиления истощения популяции T_{reg}-клеток в опухолевом окружении. Соответственно, согласно некоторым вариантам реализации изобретения, антитела против TIGIT, антитела против PD-1, антитела против PD-L1, антитела против LAG-3, HCVR и LCVR, описанные в настоящей заявке, могут быть связаны с Fc, содержащим одну или более модификаций, как правило, для изменения одного или более функциональных свойства антитела, таких как период полувыведения из сыворотки, фиксация компонента, связывание с Fc-рецептором и/или антиген-зависимая клеточная цитотоксичность.

Согласно одному варианту реализации изобретения, иммуноглобулиновый каркас для применения согласно настоящему изобретению содержит участок CH1-CH2-CH3, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в последовательностях SEQ ID NO: 155-157 и 205-215. Согласно другому варианту реализации изобретения, иммуноглобулиновый каркас содержит или по существу состоит из Fc-рецептора, такого как Fc-рецептор, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в любой из последовательностей SEQ ID NO: 195-202.

Более того, антитело, описанное в настоящей заявке, может быть модифицировано химическим путем (например, к указанному антителу могут быть присоединены один или более химических фрагментов), или указанное антитело может быть модифицировано для изменения степени его гликозилирования, для изменения его одного или более функциональных свойств. Более конкретно, согласно некоторым вариантам реализации изобретения, антитела в настоящей заявке могут содержать модификации в Fc-области для получения варианта Fc, обладающего (а) повышенной или пониженной антителозависимой клеточной цитотоксичностью (АЗКЦ), (b) повышенной или пониженной опосредованной компонентом цитотоксичностью (CDC), (c) повышенной или пониженной аффинностью в отношении C1q и/или (d) повышенной или пониженной аффинностью в отношении Fc-рецептора по сравнению с исходным Fc. Такие варианты Fc-области в целом содержат по меньшей мере одну аминокислотную модификацию в Fc-области. Особо желательным считается комбинирование аминокислотных модификаций. Например, вариант Fc-области может содержать две, три, четыре, пять и т.д. замен, например, в определенных положениях указанного Fc-области, идентифицированных в настоящей заявке.

В способах применения, в которых следует полностью избегать эффекторной функции, например, когда для достижения желаемого терапевтического эффекта достаточно только связывания антигена, а эффекторная функция приводит только к нежелательным побочным эффектам (или увеличивает риск их

возникновения), можно применять антитела IgG4 или можно разрабатывать антитела или фрагменты, лишенные Fc-области или ее значительной части, или можно вводить мутации в Fc-фрагмент для полного устранения гликозилирования (например, N297A). Альтернативно, может быть создана гибридная конструкция человеческого IgG2 (домен CH1 и шарнирный участок) и человеческого IgG4 (домены CH2 и CH3), которая лишена эффекторной функции, лишена способности связывать Fc γ R (например, IgG2) и активировать комплемент (например, IgG4). При использовании константного домена IgG4, как правило, предпочтительно включать замену S228P, которая имитирует шарнирную последовательность в IgG1 и тем самым стабилизирует молекулы IgG4, уменьшая обмен Fab-фрагментов между терапевтическим антителом и эндогенным IgG4 у пациента, проходящего лечение.

Согласно предпочтительным вариантам реализации изобретения, первый и второй нацеливающие домены представлены в гуманизованном иммуноглобулиновом каркасе. Кроме того, каркас IgG может содержать аминокислотную замену N297A или K447A.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, антитело против TIGIT, антитело против PD-1, антитело против PD-L1, антитело против LAG-3 или его фрагменты могут быть модифицированы для увеличения его биологического периода полувыведения. Могут использоваться различные подходы, включая, например, приводящие к повышению аффинности связывания Fc-области с FcRn. Согласно одному варианту реализации изобретения, антитело изменяют в пределах участка CH1 или CL таким образом, чтобы оно содержало эпитоп связывания рецептора реутилизации, полученный из двух петель домена CH2 Fc-области IgG, как описано в патентах США № 5 869 046 и 6 121 022. Нумерация остатков в Fc-области соответствует EU-индексу. Описанные в настоящей заявке варианты последовательностей приводятся со ссылкой на номер остатка с последующим обозначением аминокислоты, замещающей природную аминокислоту, и необязательно, с предшествующим обозначением природного остатка в этом положении. Если несколько аминокислот могут присутствовать в данном положении, например, если последовательности различаются между встречающимися в природе изотипами или если множество мутаций может быть внесено в этом положении, то они разделяются косой чертой (например, "X/Y/Z").

Примеры вариантов Fc, которые повышают связывание с FcRn и/или улучшают фармакокинетические свойства, включают замены в положениях 259, 308 и 434, включая, например, 259I, 308F, 428L, 428M, 434S, 434H, 434F, 434Y, и 434M. Другие варианты, которые повышают связывание Fc с FcRn, включают: 250E, 250Q, 428L, 428F, 250Q/428L (Hinton et al., 2004, J. Biol. Chem. 279(8): 6213-6216, Hinton et al. 2006 Journal of Immunology 176:346-356), 256A, 272A, 305A, 307A, 311A, 312A, 378Q, 380A, 382A, 434A (Shields et al. (2001) J. Biol. Chem., 276(9):6591-6604), 252F, 252Y, 252W, 254T, 256Q, 256E, 256D, 433R, 434F, 434Y, 252Y/254T/256E, 433K/434F/436H (Dall'Acqua et al. (2002) J. Immunol., 169:5171-5180, Dall'Acqua et al. (2006) J. Biol. Chem., 281:23514-23524 и патент США №8 367 805).

Модификация конкретных консервативных остатков в Fc-фрагменте IgG (1253, H310, Q311, H433, N434), такая как вариант N434A (Yeung et al. (2009) J. Immunol. 182: 7663), была предложена в качестве способа повышения аффинности в отношении FcRn, увеличивающего, таким образом, период полувыведения антитела из кровотока (WO 98/023289). Было показано, что комбинированный вариант Fc, содержащий M428L и N434S, повышает связывание с FcRn и увеличивает время полувыведения из сыворотки до пяти раз (Zalevsky et al. (2010) Nat. Biotechnol. 28: 157). Комбинированный вариант Fc, содержащий модификации T307A, E380A и N434A, также увеличивает период полувыведения антител IgG1 (Petkova et al. (2006) Int. Immunol. 18: 1759). Кроме того, было показано, что комбинированные варианты Fc, содержащие варианты M252Y-M428L, M428L-N434H, M428L-N434F, M428L-N434Y, M428L-N434A, M428L-N434M и M428L-N434S, увеличивают период полувыведения (патент США 2006/173170). Кроме того, сообщалось, что комбинированный вариант Fc, содержащий M252Y, S254T и T256E, увеличивает период полувыведения почти в 4 раза (Dall'Acqua et al. (2006) J. Biol. Chem. 281:23514).

Биспецифичные противоопухолевые антагонисты согласно настоящему изобретению могут быть сконструированы с каркасом IgG. Более конкретно, любой из биспецифичных антагонистов согласно настоящему изобретению может быть сконструирован с каркасом IgG1 или IgG4. Использование каркаса IgG1 является предпочтительным для лечения рака, когда мишень присутствует на антиген-презентирующих клетках, которые могут опосредовать антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ). Применение каркаса IgG4 дает возможность нацеливания на антиген в тех случаях, когда только связывание антигена является достаточным для достижения желаемых терапевтических благоприятных эффектов. Антагонисты на основе IgG4 предотвращают нежелательные эффекторные функции, связанные, например, с антителами IgG1, включая связывание Fc γ R и активацию комплемента.

Гомодимеры и гетеродимеры

Одна из проблем, связанных с эффективным получением препаратов биспецифичных антител, касается ошибочного спаривания тяжелых и легких цепей при совместной экспрессии цепей, обладающих разной специфичностью связывания. В таблице перечислены несколько вариантов аминокислотных замен для предотвращения ошибочного спаривания между тяжелыми цепями, обладающими разной специфичностью связывания, которые "усиливают" или преимущественно способствуют правильной ассоциации между желаемыми тяжелыми цепями. Для получения биспецифичных противоопухолевых анта-

гонистов в соответствии с настоящим изобретением можно использовать любой подход для предотвращения или уменьшения ошибочного спаривания между тяжелыми цепями.

Подход "выступ во впадину" (KiH) основан на модификациях в области контакта между двумя доменами СНЗ, где происходит большинство взаимодействий. Как правило, в домен СНЗ одной тяжелой цепи антитела вводят объемный остаток, который действует аналогично ключу. В другой тяжелой цепи образуется "впадина", которая может вместить этот объемный остаток, имитируя замок. Полученная гетеродимерная Fc-часть может быть дополнительно стабилизирована с помощью искусственных дисульфидных мостиков.

Альтернативный подход основан на использовании заряженных остатков с ионными взаимодействиями или стерической комплементарностью. Этот подход включает изменение полярности заряда в области взаимодействия СНЗ таким образом, что коэкспрессия электростатически сопряженных доменов Fc поддерживает благоприятные взаимодействия с притяжением и образование гетеродимеров при сохранении гидрофобного кора, тогда как неблагоприятные взаимодействия с отталкиванием зарядов подавляют гомодимеризацию, см. таблицу. Нумерация аминокислот в таблице соответствует схеме нумерации по Кабату и может быть применена к аминокислотным последовательностям тяжелой цепи антител, описанных в настоящей заявке.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, иммуноглобулиновый каркас может быть замещен другой димерной структурой, содержащей, например, домены лейциновой застежки (leucine zipper, LZ). Лейциновая застежка является обычным трехмерным структурным мотивом в белках, как правило, в виде части ДНК-связывающего домена в различных факторах транскрипции. Одна LZ обычно содержит 4-5 остатков лейцина с интервалом примерно в 7 остатков, которые образуют амфипатическую альфа-спираль с гидрофобным участком, проходящим вдоль одной стороны. Согласно конкретному варианту реализации изобретения, гетеродимерный белковый каркас содержит LZ из фактора транскрипции c-jun, связанную с LZ из фактора транскрипции c-fos. Несмотря на то, что известно, что c-jun образует гомодимеры jun-jun, а c-fos не образует гомодимеры, образование гетеродимеров jun-fos значительно преобладает над образованием гомодимеров jun-jun.

Домен лейциновой застежки может быть встроен вместо последовательностей СН2-СНЗ в белковый каркас, или он может быть размещен на карбокси-конце двух тяжелых цепей в биспецифичном противоопухолевом антагонисте. В последнем случае сайт расщепления фурином может быть введен между карбокси-концом СНЗ и аминоконцом лейциновой застежки, что позволяет облегчить фуриноопосредованное расщепление лейциновой застежки после этапа гетеродимеризации при коэкспрессии тяжелой и легкой цепей биспецифичного противоопухолевого антагониста в соответствующей системе экспрессии клеток млекопитающих (см. Wranik et al., J. Biol. Chem., 287 (5): 43331-43339, 2012).

Тип	НС1	НС2
Выступ во впадину	Y349C, T366S, L368A, Y407V	S354C, T366W
Ионное, электростатическое	S183E, E356K, E357K, D399K	S183K, K370E, K409D, K439E
Ионное, электростатическое	K392D, K409D	E356K, D399K
НА-TF замены	S364H, F405A	Y349T, T394F
HF-TA замены	S364H, T394F	Y349T, F405A
Гетеродимер лейциновой застежки	Лейциновая застежка c-Jun человека	Лейциновая застежка c-fos человека

Нумерация аминокислот в таблице соответствует схеме нумерации по Кабату и может быть применена к аминокислотным последовательностям тяжелой цепи антител, описанных в настоящей заявке. Мутации, описанные в таблице, могут быть применены к последовательности (опубликованной или нет) любой тяжелой цепи иммуноглобулина IgG1, а также к другим классам иммуноглобулинов и их подклассам (или изотипам).

При совместной экспрессии тяжелой и легкой цепей моноспецифичных, биспецифичных антител легкая цепь с одной специфичностью связывания также может ошибочно спариваться с тяжелой цепью, обладающей другой специфичностью связывания. Следовательно, согласно некоторым вариантам реализации изобретения, части тяжелой цепи, легкой цепи или обеих цепей могут быть модифицированы относительно цепей антител "дикого типа", из которых они получены, для предотвращения или уменьшения ошибочного спаривания обеих константных областей тяжелых цепей друг с другом, а также ошибочного спаривания константных областей легких цепей с их эквивалентами тяжелых цепей.

Проблема ошибочного спаривания легких цепей может быть решена несколькими способами. Со-

гласно некоторым вариантам реализации изобретения, стерически комплементарные мутации и/или дисульфидные мостики могут быть включены в две области взаимодействия VL/VH. Согласно другим вариантам реализации изобретения, могут быть включены мутации, основанные на ионных или электростатических взаимодействиях. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, ошибочное спаривание легких цепей можно предотвратить или уменьшить, используя первый фрагмент с мутацией S183E в домене CH1 тяжелой цепи и мутацией S176K в домене CL легкой цепи. Второй фрагмент может содержать мутацию S183K в домене CH1 тяжелой цепи и мутацию S176E в домене CL легкой цепи. Согласно другим вариантам реализации изобретения, используется подход "CrossMab", где один фрагмент биспецифичного противоопухолевого антагониста (например, Fab-фрагмент) остается нетронутым, но в другом фрагменте, обладающем другой специфичностью связывания, происходит обмен одного или более доменов легкой цепи с одним или более доменов тяжелой цепи на границе контакта тяжелая цепь:легкая цепь.

Способы, последовательности иммуноглобулинового домена, включая специфичные мутации для предотвращения ошибочного спаривания тяжелых и легких цепей, как описано выше, дополнительно описаны в публикациях патентных заявок США № 2014/0243505, 2013/0022601.

Конъюгаты

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, противоопухолевые антагонисты согласно настоящей заявке химически конъюгированы с одним или более пептидами и/или низкомолекулярными лекарственными средствами. Пептиды или низкомолекулярные лекарственные средства могут быть одинаковыми или разными. Пептиды или низкомолекулярные лекарственные средства могут быть присоединены, например, к восстановленным SH-группам и/или к углеводным боковым цепям. Методы получения ковалентных или нековалентных конъюгатов пептидов или низкомолекулярных лекарственных средств с антителами известны в данной области техники, и любой такой известный метод может использоваться.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, пептид или низкомолекулярное лекарственное средство присоединяют к шарнирной области компонента восстановленного антитела посредством образования дисульфидной связи. Альтернативно, такие агенты могут быть присоединены с использованием гетеробифункциональных кросс-линкеров, таких как N-сукцинил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP). Общие методы такой конъюгации хорошо известны в данной области техники. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, пептид или низкомолекулярное лекарственное средство конъюгировано через углеводный фрагмент в Fc-области антитела. Углеводная группа может использоваться для увеличения нагрузки того же агента, который связан с тиоловой группой, или углеводная группа может использоваться для связывания другого терапевтического или диагностического агента. Способы конъюгирования пептидных ингибиторов или низкомолекулярных лекарственных средств с антителами через углеводные фрагменты антитела хорошо известны специалистам в данной области техники. Например, согласно одному варианту реализации изобретения, способ включает реагирование компонента антитела, содержащего окисленную углеводную часть, с полимероносителем, который содержит по меньшей мере одну свободную функциональную аминогруппу. В результате этой реакции образуется первичная связь основания Шиффа (имин), которую можно стабилизировать путем восстановления до вторичного амина с образованием конечного конъюгата. Примеры способов конъюгирования низкомолекулярных лекарственных средств и пептидов с антителами описаны в публикации заявки на патент США № 2014/0356385.

Предпочтительно противоопухолевые антагонисты согласно настоящему изобретению сохраняют определенные желаемые характеристики и фармакокинетические свойства антител, включая желаемую стабильность *in vitro* и *in vivo* (например, одиночный период полувыведения и стабильность при хранении), эффективную доставку в желаемые клетки-мишени, повышенную аффинность в отношении партнеров связывания, желаемую антителозависимую клеточную цитотоксичность и комплемент-зависимую цитотоксичность, а также пониженный почечный клиренс или экскрецию. Соответственно, при разработке противоопухолевых антагонистов пристальное внимание может уделяться размеру и необходимости в конкретных эффекторных функциях константной области.

Размер ингибиторов TIGIT, PD-1 и PD-L1, включая полученные из них моноспецифичные, биспецифичные противоопухолевые антагонисты, может варьировать от 50 кДа до 300 кДа, от 50 кДа до 250 кДа, от 60 кДа до 250 кДа, от 80 кДа до 250 кДа, от 100 кДа до 250 кДа, от 125 кДа до 250 кДа, от 150 кДа до 250 кДа, от 60 кДа до 225 кДа, от 75 кДа до 225 кДа, от 100 кДа до 225 кДа, от 125 кДа до 225 кДа, от 150 кДа до 225 кДа, от 60 кДа до 200 кДа, от 75 кДа до 200 кДа, от 100 кДа до 125 кДа до 200 кДа, от 150 кДа до 200 кДа, от 60 кДа до 150 кДа, от 75 кДа до 150 кДа, от 100 кДа до 150 кДа, от 60 кДа до 125 кДа, от 75 кДа до 125 кДа, от 75 кДа до 100 кДа или находиться в любом диапазоне, который охватывается любой комбинацией целых чисел, перечисленных в приведенных выше диапазонах, или любых диапазонах, заданных любой комбинацией целых чисел между любыми из приведенных выше диапазонов.

Наборы

Настоящая заявка дополнительно обеспечивает набор, содержащий любой один или более антагонистов регулятора контрольных точек или противоопухолевых антагонистов согласно настоящему изобретению.

бретению. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, указанный набор также содержит дополнительные компоненты, включая шприцы и иглы для введения, а также реагенты, включая вторичные антитела для выявления и дополнительные человеческие антитела, описанные в настоящей заявке, для их применения в комбинированных терапиях. Набор, как правило, содержит этикетку и/или инструкции, указывающие предполагаемое использование содержимого набора. Указанная этикетка или инструкция может содержать любой текстовый или записанный материал, предоставленный на поверхности набора или вместе с указанным набором или иным образом сопровождающий набор.

III. Способы применения противоопухолевых антагонистов

Противоопухолевые антагонисты согласно настоящему изобретению имеют множество применений *in vitro* и *in vivo*, включая, например, усиление иммунных ответов и лечение раковых заболеваний, инфекционных заболеваний или аутоиммунных заболеваний.

Согласно конкретным вариантам реализации, настоящее изобретение обеспечивает способ лечения клеточного пролиферативного расстройства; способ уменьшения или истощения популяции регуляторных Т-клеток в опухоли; способ лечения микробной инфекции или способ лечения иммунологического расстройства, где указанный способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества противоопухолевого антагониста в соответствии с настоящей заявкой.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, противоопухолевые антагонисты согласно настоящему изобретению вводят в клетки в культуре *in vitro* или *ex vivo* или субъектам, представляющим собой людей, например, *in vivo*, для усиления иммунитета при различных заболеваниях. Соответственно, в настоящей заявке предложены способы модификации иммунного ответа у субъекта, включающие введение указанному субъекту антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, как описано в настоящей заявке, таким образом, чтобы происходило усиление, стимулирование или повышение иммунного ответа у указанного субъекта. Предпочтительные субъекты включают пациентов, представляющих собой людей, для которых желательным является усиление иммунного ответа. Способы являются особо применимыми для лечения пациентов, представляющих собой людей, страдающих расстройством, которое можно лечить путем усиления иммунного ответа (например, иммунного ответа, опосредованного Т-клетками). Способы являются особо применимыми для лечения рака или хронических инфекций *in vivo*. Например, композиции антител против TIGIT, антител против PD-1, антител против PD-L1 или антител против LAG-3 можно вводить вместе с интересующим антигеном, или антиген может уже присутствовать в организме субъекта, подлежащего лечению (например, субъекта, содержащего опухоль или вирус), для усиления антиген-специфичного иммунитета. При введении антител против TIGIT вместе с другим агентом может осуществляться раздельное или одновременное введение.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, антагонист регулятора контрольных точек, используемый в соответствии с описанным выше способом, представляет собой антитело против TIGIT, антитело против PD-1, антитело против PD-L1, антитело против LAG-3, их фрагмент или их комбинацию. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, антагонист регулятора контрольных точек представляет собой моноспецифичное или биспецифичное антитело.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, антагонист регуляторов контрольных точек или противоопухолевый антагонист представлен в виде антитела или фрагмента антитела. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, антитела, описанные в настоящей заявке, представляют собой антитела человека или гуманизированные антитела.

Также включены способы выявления присутствия и/или измерения человеческого TIGIT, человеческого PD-1, человеческого PD-L1 или человеческого LAG3 в образце, включающие контактирование образца и контрольного образца с человеческим моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, который специфично связывается с человеческим TIGIT, человеческим PD-1 или человеческим PD-L1 в условиях, позволяющих образование комплекса между антителом или его фрагментом и человеческим TIGIT, человеческим PD-1 или человеческим PD-L1. Затем выявляют образование комплекса, при этом разница в образовании комплексов между образцом и контрольным образцом указывает на присутствие человеческого антигена TIGIT в образце.

Учитывая способность антител против TIGIT, антител против PD-1, антител против PD-L1 и антител против LAG-3 блокировать ингибирование или коингибирование Т-клеточных ответов, например, антиген-специфичных Т-клеточных ответов, согласно настоящему изобретению предложены способы *in vitro* и *in vivo* применения антител, описанных в настоящей заявке, для стимуляции, усиления или положительной регуляции антиген-специфичных Т-клеточных ответов, например, противоопухолевых Т-клеточных ответов. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, также обеспечивается стимуляция CD3 (например, путем совместного инкубирования с клеткой, экспрессирующей мембранный CD3), причем такая стимуляция может осуществляться одновременно, до или после обработки антителом против TIGIT, антителом против PD-1, антителом против PD-L1 или антителом против LAG-3. Например, согласно настоящему изобретению, предложен способ усиления антиген-специфичного Т-клеточного ответа, включающий контактирование Т-клетки с антителом против TIGIT, антителом против PD-1, антителом против PD-L1 или антителом против LAG-3, описанным в настоящей заявке, и необязательно CD3 таким образом, что происходит усиление антиген-специфичного Т-клеточного ответа, на-

пример, путем удаления ингибирующего эффекта, опосредованного TIGIT, PD-1, PD-L1 или LAG-3. Для измерения антиген-специфичного Т-клеточного ответа можно использовать любой подходящий показатель антиген-специфичного Т-клеточного ответа. Неограничивающие примеры таких подходящих показателей включают повышенную пролиферацию Т-клеток в присутствии антитела и/или увеличение продукции цитокинов в присутствии антитела. Согласно предпочтительному варианту реализации изобретения, происходит усиление продукции интерлейкина-2 и/или интерферона-гамма антиген-специфичными Т-клетками.

Также включены способы усиления иммунного ответа (например, антиген-специфичного Т-клеточного ответа) у субъекта, включающие введение указанному субъекту антитела против TIGIT, антитела против PD-1, антитела против PD-L1, антитела против LAG-3 или биспецифичного противоопухолевого антагониста, описанного в настоящей заявке, таким образом, что происходит усиление иммунного ответа (например, антиген-специфичного Т-клеточного ответа) у указанного субъекта. Согласно предпочтительному варианту реализации изобретения, субъект представляет собой субъекта, содержащего опухоль, и иммунный ответ против указанной опухоли усиливается. Опухоль может представлять собой солидную опухоль или опухоль жидких тканей, например гематологическую злокачественную опухоль. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, опухоль представляет собой иммуногенную опухоль. Согласно другим вариантам реализации изобретения, опухоль не является иммуногенной. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, опухоль является PD-L1-положительной. Согласно другим вариантам реализации изобретения, опухоль является PD-L1-отрицательной. Субъект также может представлять собой субъекта, содержащего вирус, у которого иммунный ответ против указанного вируса усиливается вследствие введения антитела против TIGIT, антитела против PD-1, антитела против PD-L1, антитела против LAG-3, моноспецифичного противоопухолевого антагониста или биспецифичного противоопухолевого антагониста, как описано в настоящей заявке.

Согласно одному варианту реализации изобретения, способ ингибирования роста опухолевых клеток у субъекта включает введение указанному субъекту антитела против TIGIT, антитела против PD-1, антитела против PD-L1, антитела против LAG-3 или биспецифичного противоопухолевого антагониста, описанного в настоящей заявке, таким образом, что рост опухоли ингибируется у указанного субъекта. Также предложены способы лечения хронической вирусной инфекции у субъекта, включающие введение указанному субъекту антитела против TIGIT, антитела против PD-1, антитела против PD-L1, антитела против LAG-3 или биспецифичного противоопухолевого антагониста, как описано в настоящей заявке, таким образом, что происходит лечение хронической вирусной инфекции у субъекта.

Настоящее изобретение также включает способы обеспечения истощения популяции T_{reg} -клеток в опухолевом микроокружении у субъекта, содержащего опухоль, например, раковую опухоль, включающие введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества антитела против TIGIT, антитела против PD-1, антитела против PD-L1, антитела против LAG-3 или биспецифичного противоопухолевого антагониста, описанного в настоящей заявке, содержащего Fc-фрагмент, который стимулирует истощение популяции T_{reg} -клеток в опухолевом микроокружении. Fc может представлять собой, например, Fc, обладающий эффекторной функцией или усиленной эффекторной функцией, например, Fc, связывающийся или усиленно связывающийся с одним или более активирующими Fc-рецепторами.

Согласно предпочтительному варианту реализации, истощение популяции T_{reg} -клеток происходит без значительного истощения или ингибирования популяции T_{eff} -клеток в опухолевом микроокружении, а также без значительного истощения или ингибирования T_{eff} - и T_{reg} -клеток за пределами микроокружения опухоли. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, у субъекта наблюдается более высокий уровень TIGIT на T_{reg} -клетках по сравнению с T_{eff} -клетками, например, в микроокружении опухоли. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, антитела против TIGIT или антагонисты TIGIT могут вызывать истощение популяции T_{reg} -клеток в опухолях и/или T_{reg} -клеток в лимфоцитах, инфильтрирующих опухоль (TIL). Например, на модели опухоли CT26 антитело против TIGIT мыши в форме мышинного IgG2a (который проявляет эффекторную функцию) приводило к частичному истощению популяции как T_{reg} -клеток, так и $CD8^+$ Т-клеток, но не вызывало истощения популяции $CD4^+$ Т-клеток. Эквивалентное антитело против TIGIT, не обладающее эффекторной функцией, представленное в форме мышинного IgG1 D265A, не приводило к истощению популяции Т-клеток.

При решении вопроса о том, использовать ли Fc-фрагмент, обладающий эффекторной функцией, или неэффекторное антитело против TIGIT, следует должным образом учитывать баланс между истощением популяции T_{reg} -клеток, которое может усиливать противоопухолевый иммунный ответ, и истощением популяции $CD8^+$ Т-клеток, которое приводит к устранению некоторых из клеток, необходимых для реального уничтожения опухолевых клеток. Несмотря на то, что можно ожидать, что истощение T_{reg} -клеток повысит противоопухолевую активность, недавние исследования показали, что связывание TIGIT с TIGIT⁺ T_{reg} -клетками способствует опосредованному T_{reg} подавлению пролиферации T_{eff} -клеток (Joller et al. (2014) *Immunity* 40: 569), что позволяет предположить, что блокирование сигналинга TIGIT (например, с использованием антитела-антагониста TIGIT согласно настоящему изобретению) также может усиливать противоопухолевую активность. Соответственно, наиболее эффективным может быть использование антитела-антагониста TIGIT, не обладающего эффекторной функцией, которое: i) блокирует

сигналинг TIGIT в T_{reg}-клетках, снижая таким образом их иммуносупрессорную активность; ii) активирует противоопухолевые CD8⁺ Т-клетки путем блокирования ингибирующих эффектов TIGIT, в то же время избегая истощения их популяции, опосредованного эффекторной функцией, и iii) усиливает активацию, опосредованную DNAM, позволяя DNAM связываться с PVR (CD155, лиганд TIGIT), который в противном случае связывался бы TIGIT (и уменьшая непосредственные взаимодействия TIGIT-DNAM) (Johnston et al. (2014) Cancer Cell 26: 923). То же самое применимо к использованию антител против PD-1, антител против PD-L1 или биспецифичных противоопухолевых антагонистов.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, антитело против TIGIT, антитело против PD-1, антитело против PD-L1, антитело против LAG-3 или биспецифичный противоопухолевый антагонист, описанный в настоящей заявке, предоставляется субъекту в качестве вспомогательной терапии. Лечение пациента, страдающего раком, с помощью антитела против TIGIT, антитела против PD-1, антитела против PD-L1, антитела против LAG-3 или биспецифичного противоопухолевого антагониста в соответствии с настоящей заявкой может приводить к долгосрочному устойчивому ответу по сравнению с действующим стандартом лечения; долгосрочной выживаемости по меньшей мере в течение 1, 2, 3, 4, 5, 10 или более лет, безрецидивной выживаемости по меньшей мере в течение 1, 2, 3, 4, 5 или 10 или более лет. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, лечение пациента, страдающего раком, с помощью антитела против TIGIT, антитела против PD-1, антитела против PD-L1, антитела против LAG-3 или биспецифичного противоопухолевого антагониста предотвращает рецидив рака или задерживает рецидив рака, например, на 1, 2, 3, 4, 5 или 10 или более лет. Лечение с помощью антитела против TIGIT, против PD-1, против PD-L1 и/или против LAG-3 может использоваться в качестве терапии первой или второй линии.

Согласно конкретным предпочтительным вариантам реализации изобретения, субъект страдает клеточным пролиферативным расстройством или раком. Блокирование передачи сигналов PVR/нектин-2 через TIGIT антителами против TIGIT может приводить к усилению иммунного ответа на раковые клетки у пациента. В настоящей заявке предложены способы лечения субъекта, страдающего раком, включающие введение указанному субъекту антитела против TIGIT, антитела против PD-1, антитела против PD-L1, антитела против LAG-3 или биспецифичного противоопухолевого антагониста указанных антигенов, как описано в настоящей заявке, таким образом, что происходит лечение субъекта, например, таким образом, что рост раковых опухолей подавляется или уменьшается и/или происходит регрессия опухолей. Антитела против TIGIT, антитела против PD-1, антитела против PD-L1, антитела против LAG-3 или биспецифичный противоопухолевый антагонист указанных антигенов, как описано в настоящей заявке, можно использовать отдельно для подавления роста раковых опухолей. Альтернативно, любой из указанных противоопухолевых антагонистов можно использовать в сочетании с другим агентом, например, другими противораковыми мишенями, иммуногенными агентами, стандартными методами лечения рака или другими антителами, как описано ниже.

Соответственно, в настоящей заявке предложены способы лечения рака, например, путем ингибирования роста опухолевых клеток у субъекта, включающие введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества антагониста TIGIT, PD-1, PD-L1 или LAG-3 или биспецифичного противоопухолевого антагониста, как описано в настоящей заявке. Предпочтительно антитело представляет собой человеческое антитело против TIGIT, антитело против PD-1, антитело против PD-L1 или антитело против LAG-3, содержащее HCVR и LCVR указанного антитела против TIGIT, антитела против PD-1, антитела против PD-L1 или антитела против LAG-3, описанного в настоящей заявке, или указанное антитело может представлять собой гибридное, гуманизованное или нечеловеческое антитело против hu TIGIT, против hu PD-1, против PD-L1 или против LAG-3, например гибридное, гуманизованное или нечеловеческое антитело против TIGIT, антитело против PD-1, антитело против PD-L1 или антитело против LAG-3, которое конкурирует за связывание или связывается с тем же эпитопом, что и по меньшей мере одно из антител против TIGIT, против PD-1, против PD-L1 или против LAG-3, описанных в настоящей заявке.

Виды рака, рост которых можно подавлять с помощью антител согласно изобретению, как правило, включают рак, отвечающий на иммунотерапию. Неограничивающие примеры видов рака, которые можно лечить, включают плоскоклеточный рак, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, плоскоклеточный немелкоклеточный рак легкого (НМКРЛ), не НМКРЛ, глиому, рак желудочно-кишечного тракта, рак почек (например, светлоклеточный рак), рак яичников, рак печени, колоректальный рак, рак эндометрия, почечный рак (например, почечноклеточный рак (ПКР)), рак предстательной железы (например, гормонорезистентную аденокарциному предстательной железы), рак щитовидной железы, нейроblastому, рак поджелудочной железы, глиобластому (мультиформную глиобластому), рак шейки матки, рак желудка, рак мочевого пузыря, гепатому, рак молочной железы, рак толстой кишки и рак (или карциному) головы и шеи, рак желудка, эмбрионально-клеточную опухоль, детскую саркому, синоназальную опухоль из естественных киллеров, меланому (например, метастатическую злокачественную меланому, например, кожную или внутриглазную злокачественную меланому), рак костей, рак кожи, рак матки, рак анальной области, рак яичек, рак маточных труб, рак эндометрия, рак шейки матки, рак влагалища, рак вульвы, рак пищевода, рак тонкой кишки, рак эндокринной системы, рак парашито-

видной железы, рак надпочечника, саркому мягких тканей, рак уретры, рак полового члена, детские солидные опухоли, рак мочеочника, рак почечной лоханки, неоплазму центральной нервной системы (ЦНС), первичную лимфому ЦНС, опухолевый ангиогенез, опухоль спинного мозга, глиому ствола головного мозга, аденому гипофиза, саркому Капоши, эпидермоидный рак, плоскоклеточный рак, Т-клеточную лимфому, раковые заболевания, вызванные окружающими условиями среды, в том числе вызванные асбестом, связанные с вирусом раковые заболевания (например, опухоль, связанную с вирусом папилломы человека (ВПЧ)), и гематологические злокачественные новообразования, происходящие из любой из двух основных линий клеток крови, т.е. миелоидной линии клеток (из которой происходят гранулоциты, эритроциты, тромбоциты, макрофаги и тучные клетки) или лимфоидной линии клеток (из которой происходят В-клетки, Т-клетки, NK-клетки и плазматические клетки), такие как все типы лейкозов, лимфом и миелом, например, острый, хронический, лимфоцитарный и/или миелогенный лейкоз, такой как острый лейкоз (ОЛЛ), острый миелогенный лейкоз (ОМЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ) и хронический миелогенный лейкоз (ХМЛ), недифференцированный ОМЛ (МО), миелобластный лейкоз (М1), миелобластный лейкоз (М2; с созреванием клеток), промиелоцитарный лейкоз (вариант М3 или М3 [М3V]), миеломоноцитарный лейкоз (вариант М4 или М4 с эозинофилией [М4Е]), моноцитарный лейкоз (М5), эритролейкоз (М5), эритролейкоз, мегакариобластный лейкоз (М7), изолированную гранулоцитарную саркому и хлорому; лимфомы, такие как ходжкинская лимфома (HL), неходжкинская лимфома (NEIL), В-клеточные лимфомы, Т-клеточные лимфомы, лимфоплазмацитоидная лимфома, моноцитотидная В-клеточная лимфастома, лимфома лимфоидной ткани слизистых оболочек (MALT), анапластическая (например, Ki 1⁺) крупноклеточная лимфома, Т-клеточная лимфома/лейкоз взрослых, лимфома из клеток мантии, ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома, ангиоцентрическая лимфома, кишечная Т-клеточная лимфома, первичная медиастинальная В-клеточная лимфома, Т-лимфобластная лимфома из клеток-предшественников, Т-лимфобластная лимфома и лимфома/лейкоз (T-Lbly/T-ALL), периферическая Т-клеточная лимфома, лимфобластная лимфома, посттрансплантационное лимфолиферативное заболевание, истинная гистиоцитарная лимфома, первичная лимфома центральной нервной системы, первичная выпотная лимфома, лимфобластная лимфома (ЛБЛ), гематопозитические опухоли лимфоидной линии клеток, острый лимфобластный лейкоз, диффузная В-крупноклеточная лимфома, лимфома Беркитта, фолликулярная лимфома, диффузная гистиоцитарная лимфома (ДГЛ), иммунобластная крупноклеточная лимфома, В-лимфобластные лимфомы из клеток-предшественников, Т-клеточная лимфома кожи (Т-КЛК, также называемая фунгоидным микозом или синдромом Сезари) и лимфоплазмацитоидная лимфома (ЛПЛ) с макроглобулинемией Вальденстрема; миеломы, такие как миелома с секрецией IgG, миелома с секрецией легких цепей, несекреторная миелома, тлеющая миелома (также называемая невыраженной миеломой), одиночная плазмацитома и множественные миеломы, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), волосистоклеточная лимфома; гемопозитические опухоли миелоидного происхождения; опухоли мезенхимального происхождения, включая фибросаркому и рабдомиосаркому; саркому, тератокарциному, опухоли центральной и периферической нервной системы, включая астроцитому, шванномы; опухоли мезенхимального происхождения, включая фибросаркому, рабдомиосаркому и остеосаркому; и другие опухоли, в том числе меланому, пигментную ксеродермию, кератоакантому, саркому, фолликулярный рак щитовидной железы и тератокарциному, гемопозитические опухоли лимфоидной линии, например, Т-клеточные и В-клеточные опухоли, включая, но не ограничиваясь указанными, Т-клеточные расстройства, такие как Т-пролимфоцитарный лейкоз (Т-ПЛЛ), включая мелкоклеточный и медуллярноклеточный тип; лейкоз больших гранулярных лимфоцитов (БЛГ), предпочтительно Т-клеточного типа; a/d Т-клеточную НХЛ печени и селезенки; периферическую/посттимульную Т-клеточную лимфому (плеоморфные и иммунобластные подтипы); ангиоцентрическую (назальную) Т-клеточную лимфому; рак головы или шеи, рак почек, рак прямой кишки, рак щитовидной железы; острую миелоидную лимфому, а также любые комбинации указанных видов рака. Описанные в настоящей заявке способы также можно применять для лечения метастатического рака, резистентного рака (например, рака, резистентного к предшествующей иммунотерапии, например, блокирующим антителом против CTLA-4 или против PD-1) и рецидивирующего рака.

Антитело против TIGIT, антитело против PD-1, антитело против PD-L1, антитело против LAG-3 или биспецифичный противоопухолевый антагонист можно вводить отдельно, в комбинации с другим противоопухолевым антагонистом или одновременно с другим противоопухолевым антагонистом. Антитело против TIGIT, антитело против PD-1, антитело против LAG-3 или биспецифичный противоопухолевый антагонист также можно вводить в комбинации или одновременно с иммуногенным агентом, таким как раковые клетки, противоопухолевые вакцины, очищенные опухолевые антигены (включая рекомбинантные белки, пептиды и молекулы углеводов), клетки, трансфицированные генами, кодирующими иммуностимулирующие цитокины, в рамках стратегии противораковой вакцинации (He et al. (2004) *J. Immunol.* 173: 4919-28), или онколитическим вирусом.

Было разработано множество экспериментальных стратегий противоопухолевой вакцинации. Согласно одной из таких стратегий вакцину готовят с использованием аутологичных или аллогенных опухолевых клеток. Было показано, что некоторые из этих клеточных вакцин являются наиболее эффективными, когда указанные опухолевые клетки трансдуцируют для экспрессии гранулоцитарно-

макрофагального колониестимулирующего фактора (granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF). Было показано, что GM-CSF является мощным активатором антигенной презентации для противоопухолевой вакцинации (Dranoff et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 3539-43). На доклинических моделях было показано, что противораковые вакцины усиливают инфильтрацию опухолей эффекторными Т-клетками. Основные типы противораковых вакцин включают пептидные вакцины, векторные антиген-специфичные вакцины, цельноклеточные вакцины и вакцины на основе дендритных клеток. Все терапии на основе вакцин разработаны для доставки одного или множества антигенных эпитопов или антигенов из целых клеток пациентам и стимулируют специфичные в отношении опухоли эффекторные Т-клетки. Таким образом, терапия на основе вакцин может являться наиболее эффективным способом индукции инфильтрации опухоли Т-клетками.

Изучение экспрессии генов и крупномасштабный анализ паттернов генной экспрессии в различных опухолях привели к определению так называемых опухолеспецифичных антигенов (Rosenberg, S. A. (1999) Immunity 10: 281-7). Во многих случаях указанные опухолеспецифичные антигены представляют собой дифференцировочные антигены, экспрессируемые в опухолях и в клетке, из которой возникла указанная опухоль, например антигены меланоцитов gp100, антигены MAGE и Trp-2. Еще более важной является возможность показать, что многие из указанных антигенов являются мишенями опухолеспецифичных Т-клеток, обнаруживаемых в организме хозяина.

Ингибирование TIGIT, PD-1, PD-L1 и/или LAG-3 можно использовать в сочетании с набором рекомбинантных белков и/или пептидов, экспрессируемых в опухоли, для того чтобы вызвать иммунный ответ на указанные белки. Иммунная система может воспринимать такие белки как аутоантигены и, следовательно, быть к ним толерантной. Опухолевый антиген может включать протеин-теломеразу, которая необходима для синтеза теломер хромосом и которая экспрессируется более чем в 85% видов рака человека и только в ограниченном количестве соматических тканей (Kim et al. (1994) Science 266: 2011-2013). Опухолевые антигены также могут представлять собой "неоантигены", экспрессируемые раковыми клетками в результате соматических мутаций, которые приводят к изменению белковой последовательности или созданию белков слияния между двумя неродственными последовательностями (например, bcr-abl в хромосоме Philadelphia), или идиотип из В-клеточных опухолей.

Неограничивающие примеры противоопухолевых вакцин включают сипулейцел-Т (Provenge®), одобренную Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA) противоопухолевую вакцину для лечения метастатического рака предстательной железы; опухолевые клетки, трансфицированные для экспрессии цитокинового гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF), такие как цельноклеточная GM-CSF-секретирующая облученная аллогенная вакцина на основе клеток рака поджелудочной железы (GVAX; Johns Hopkins); мультипептидную вакцину, состоящую из иммуногенных пептидов, происходящих из антигенов рака молочной железы, пептиды, легумена и β-катенина, которая обеспечивала продление вызванной вакциной выживаемости без прогрессирования заболевания у мышей, имеющих опухоль молочной железы, при введении в комбинации с антителом против PD-1 (Karyampudi L. et al. (2014) Cancer Res 74: 2974-2985); пептиды антигенов меланомы, такие как пептиды gp100, антигены MAGE, Trp-2, MART1 и/или тирозиназа. Другие противоопухолевые вакцины включают белки вирусов, вовлеченных в раковые заболевания человека, таких как вирусы папилломы человека (ВПЧ) (например, Gardasil®, Gardasil 9® и Cervarix®); вирус гепатита В (например, Engerix-B и Recombivax HB); вирус гепатита С (ВГС), вирус герпеса, ассоциированный с саркомой Капоши (ВГСК). Другой формой опухолеспецифического антигена, который может использоваться в сочетании с ингибированием TIGIT, являются очищенные белки теплового шока (heat shock proteins, HSP), выделенные из самой опухолевой ткани. Указанные белки теплового шока содержат фрагменты белков опухолевых клеток и являются высокоэффективными при доставке к антиген-презентирующим клеткам для индукции противоопухолевого иммунитета. Талимоген лахерпарепвек (T-VEC, или Imlygic®) представляет собой одобренный FDA онколитический вирус для лечения некоторых пациентов с метастатической меланомой, которая не может быть удалена хирургическим путем.

Дендритные клетки (ДК) представляют собой мощные антиген-презентирующие клетки, которые можно использовать для примирования иммунной системы к выработке антиген-специфичных ответов. ДК можно получать *ex vivo* и нагружать различными белковыми и пептидными антигенами, а также экстрактами опухолевых клеток (Nestle et al. (1998) Nature Medicine 4: 328-332). ДК также можно трансдуцировать генетическим путем для экспрессии указанных опухолевых антигенов. ДК также были непосредственно слиты с опухолевыми клетками в целях иммунизации (Kugler et al. (2000) Nature Medicine 6: 332-336). В качестве метода вакцинации иммунизацию с помощью ДК можно эффективно сочетать с блокированием TIGIT для активации (восстановления) более мощных противоопухолевых ответов.

Ингибирование TIGIT, PD-1, PD-L1 и/или LAG-3 также можно комбинировать со стандартными методами лечения рака (например, хирургическим вмешательством, лучевой терапией и химиотерапией). В частности, ингибирование TIGIT, PD-1, PD-L1 и/или LAG-3 можно эффективно комбинировать с химиотерапевтическими режимами. В указанных примерах доза вводимого химиотерапевтического реагента может быть снижена (Mokyr et al. (1998) Cancer Research 58: 5301-5304). Примером такой комбинации

является применение противоопухолевого антагониста в комбинации с декарбазином для лечения меланомы. Другим примером такой комбинации является применение антагониста регулятора контрольных точек или противоопухолевого антагониста в комбинации с интерлейкином-2 (IL-2) для лечения меланомы. Например, научным обоснованием комбинированного использования ингибирования TIGIT, PD-1, PD-L1 и/или LAG-3 и химиотерапии для обеспечения гибели клеток является цитотоксическое действия большинства химиотерапевтических соединений, которое должно приводить к повышению уровня опухолевого антигена в пути антигенной презентации. Другие комбинированные терапии, которые могут приводить к синергическому эффекту с ингибированием TIGIT, PD-1, PD-L1 и/или LAG-3 посредством гибели клеток, представляют собой лучевую терапию, хирургическое вмешательство и гормональную депривацию. Каждый из указанных протоколов обеспечивает источник опухолевого антигена в организме хозяина. Ингибиторы ангиогенеза также можно комбинировать с ингибированием TIGIT, PD-1, PD-L1 и/или LAG-3. Ингибирование ангиогенеза приводит к гибели опухолевых клеток, которые могут представлять опухолевый антиген для пути антигенной презентации хозяина.

Антитела против TIGIT, антитела против PD-1, антитела против PD-L1, антитела против LAG-3 и биспецифичные противоопухолевые антагонисты, описанные в настоящей заявке, также можно применять в комбинации с биспецифичными антителами, которые нацеливают экспрессирующие Fc α - или Fc γ -рецептор эффекторные клетки на опухолевые клетки (см., например, патенты США № 5 922 845 и 5 837 243). Биспецифичные антитела можно применять для нацеливания на два отдельных антигена. Например, биспецифичные антитела против рецептора Fc/опухолевого антигена (например, Her-2/neu) использовали для нацеливания макрофагов на опухолевый очаг. Такое нацеливание может приводить к более эффективной активации опухолеспецифичных ответов. Ингибирование TIGIT, PD-1, PD-L1 и/или LAG-3 могло бы приводить к усилению Т-клеточного звена этих ответов. Альтернативно, антиген можно доставлять непосредственно к ДК с использованием биспецифичных антител, которые связываются с опухолевым антигеном и маркером клеточной поверхности, специфичным для дендритных клеток.

Ускользание опухолей от иммунного надзора организма-хозяина обеспечивается с помощью большого разнообразия механизмов. Многие из этих механизмов можно преодолевать путем инактивации иммуносупрессорных белков, экспрессируемых опухолями. К ним относятся, среди прочих, TGF- β , IL-10 и Fas-лиганд. Антитела к каждому из указанных соединений можно использовать в комбинации с противоопухолевыми антагонистами, описанными в настоящей заявке, для противодействия эффектам иммуносупрессорного агента и содействия иммунным противоопухолевым ответам хозяина.

Другие антитела, которые активируют иммунологическую реактивность хозяина, можно использовать в комбинации с противоопухолевыми антагонистами, описанными в настоящей заявке. Указанные антитела включают молекулы на поверхности дендритных клеток, которые активируют функцию ДК и презентацию антигена. Антитела против CD40 способны эффективно замещать активность хелперных Т-клеток (Ridge et al. (1998) *Nature* 393: 474-478) и могут использоваться вместе с антителами против TIGIT. Активирующие антитела к костимулирующим Т-клетки молекулам, такие как OX-40 (Weinberg et al. (2000) *Immunol* 164: 2160-2169), CD137/4-1BB (Melero et al. (1997) *Nature Medicine* 3: 682-685 (1997) и ICOS (Hutloff et al. (1999) *Nature* 397: 262-266), также могут обеспечивать повышенный уровень активации Т-клеток. Кроме того, ингибиторы других регуляторов иммунных контрольных точек также могут использоваться в сочетании с другими противоопухолевыми антагонистами, описанными в настоящей заявке, как дополнительно описано ниже.

Трансплантация костного мозга в настоящее время используется для лечения различных опухолей гематопозитического происхождения. В то время как следствием этого лечения является болезнь "трансплантат против хозяина", ингибирование TIGIT можно применять для повышения эффективности донорских пересаженных опухолеспецифичных Т-клеток путем уменьшения реакции "трансплантат против опухоли".

Ex vivo активация и размножение антиген-специфичных Т-клеток и адоптивный перенос этих клеток реципиентам для стимуляции антиген-специфичных Т-клеток против рака или вирусных инфекций в присутствии антител против TIGIT может приводить к повышению частоты переноса и активности адоптивно перенесенных Т-клеток.

Существует также несколько экспериментальных протоколов лечения, которые включают активацию ex vivo и размножение антиген-специфичных Т-клеток и адоптивный перенос этих клеток реципиентам для стимуляции антиген-специфичных Т-клеток, направленных против опухоли (Greenberg & Riddell (1999) *Science* 285: 546-51). Эти методы также можно использовать для активации Т-клеточных ответов на инфекционные агенты, такие как ЦМВ. Активация ex vivo в присутствии антител против TIGIT может увеличить частоту переноса и активность адоптивно перенесенных Т-клеток.

Согласно конкурентным вариантам реализации изобретения, описанный в настоящей заявке противоопухолевый антагонист можно вводить субъекту, страдающему инфекционным заболеванием, в частности, хроническими инфекциями. В указанном случае, как и в случае применения для лечения рака, опосредованное антителами ингибирование TIGIT, PD-1, PD-L1 и/или LAG-3 можно использовать отдельно или в качестве адьюванта в комбинации с вакцинами для усиления иммунного ответа на патогены, токсины и аутоантигены. Примеры патогенов, в отношении которых можно применять данный тера-

пептический подход, включают, но не ограничиваются указанными, ВИЧ, гепатит (А, В и С), грипп, герпес, лямблий, малярийный плазмодий, лейшманию, *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*. Ингибирование TIGIT, PD-1, PD-L1 и/или LAG-3 является особо применимым для лечения установленных инфекций, вызванных такими агентами, как ВИЧ, которые представляют новые или измененные антигены в ходе инфекций. Введение антител против TIGIT, антител против PD-1, антител против PD-L1 или биспецифичных противоопухолевых антагонистов может обеспечить распознавание указанных антигенов как чужеродных агентов для индукции соответствующего Т-клеточного ответа.

Другие патогенные вирусы, вызывающие инфекции, которые можно лечить с помощью описанных в настоящей заявке способов, включают ВИЧ, гепатит (А, В или С), герпесвирусные инфекции (например, VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II и ЦМВ, вирус Эпштейна-Барра), а также инфекции, вызванные аденовирусом, вирусом гриппа, флавивирусом, эховирусами, риновирусами, вирусами Коксаки, коронавирусом, респираторно-синцитиальными вирусами, вирусами паротита, ротавирусом, вирусом кори, вирусом краснухи, парвовирусом, вирусом осповакцины, вирусом HTLV, вирусом Денге, папилломавирусом, вирусом контактиозного моллюска, полиовирусом, вирусом бешенства, вирусом JC, вирусом арбовирусного энцефалита или их комбинацией.

Примеры патогенных бактерий или заболеваний, вызываемых указанными бактериями, которые можно лечить с помощью способов, описанных в настоящей заявке, включают *Chlamydia*, *Rickettsia*, *Mycobacteria*, *Staphylococci*, *Streptococci*, *Pneumococci*, *Meningococci* и *Gonococci*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Legionella*, *Diphtheria*, *Salmonella*, *Bacilli*, *Cholera*, *Leptospirosis tetanus*, ботулизм, сибирскую язву, чуму и болезнь Лайма.

Примеры патогенных грибов, вызывающих инфекции, которые можно лечить с помощью способов, описанных в настоящей заявке, включают *Candida* (например, *albicans*, *krusei*, *glabrata*, *tropicalis* и т.д.), *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* (например, *fumigatus*, *niger* и т.д.), *Mucorales* (например, *mucor*, *absidia*, *rhizopus*), *Sporothrix schenkii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* и *Histoplasma capsulatum*.

Примеры патогенных паразитов, вызывающих инфекции, которые можно лечить с помощью способов, описанных в настоящей заявке, включают *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba sp.*, *Giardia Zambia*, *Cryptosporidium sp.*, *Pneumocystis carinii*, *Plasmodium vivax*, *Babesia microti*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, *Nippostrongylus brasiliensis*.

Во всех приведенных выше способах ингибирование TIGIT, PD-1, PD-L1 и/или LAG-3 можно комбинировать с другими видами иммунотерапии, такими как лечение цитокинами (например, интерферонами, GM-CSF, G-CSF, IL-2) или терапия биспецифичными антителами с использованием двух разных специфичностей связывания для обеспечения усиленной презентации опухолевых антигенов.

Антитела против TIGIT, антитела против PD-1, антитела против PD-L1, антитела против LAG-3 и биспецифичные противоопухолевые антагонисты, описанные в настоящей заявке, можно использовать для усиления антиген-специфичных иммунных ответов путем введения одного или более любых из указанных антител совместно с интересующим антигеном (например, вакциной). Соответственно, в настоящей заявке предложены способы, усиливающие иммунный ответ на антиген у субъекта, включающие введение указанному субъекту: (i) антигена и (ii) антитела против TIGIT, антитела против PD-1, антитела против PD-L1, антитела против LAG-3 или биспецифичного противоопухолевого антагониста или их комбинации таким образом, что происходит усиление иммунного ответа на антиген у указанного субъекта. Антиген может представлять собой, например, опухолевый антиген, вирусный антиген, бактериальный антиген или антиген из патогена. Неограничивающие примеры таких антигенов включают антигены, обсуждаемые в разделах выше, такие как опухолевые антигены (или опухолевые вакцины), обсуждаемые выше, или антигены из вирусов, бактерий или других патогенов, описанные выше.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, пептид или белок слияния, содержащий эпитоп, с которым связывается антитело против TIGIT, антитело против PD-1, антитело против PD-L1, антитело против LAG-3 или биспецифичный противоопухолевый антагонист, может применяться в качестве вакцины вместо или помимо противоопухолевого антагониста (антагонистов).

Подходящие способы *in vivo* и *in vitro* введения композиций антител (например, моноклональных антител человека, мультиспецифичных антител или антагонистов и иммуноконъюгатов), описанных в настоящей заявке, хорошо известны в данной области техники и могут быть выбраны специалистом в данной области техники. Например, композиции антител можно вводить путем инъекции (например, внутривенной или подкожной). Подходящие используемые дозы молекул будут зависеть от возраста и массы тела субъекта и концентрации и/или лекарственной формы композиции антител.

Комбинированные терапии

Согласно другому аспекту, настоящее изобретение обеспечивает комбинированные терапии для усиления антиген-специфичного Т-клеточного ответа у субъекта. Согласно одному варианту реализации изобретения, способ включает контактирование Т-клетки с антителом против TIGIT, антителом против PD-1, антителом против PD-L1, антителом против LAG-3, фрагментом указанного антитела или биспецифичным противоопухолевым антагонистом в комбинации со вторым антителом, фрагментом антитела,

антагонистом или лекарственным средством таким образом, что происходит усиление антиген-специфического Т-клеточного ответа или апоптотического пути. Например, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, первое антитело или фрагмент антитела специфично связывается с TIGIT, и второе антитело или фрагмент антитела специфично связывается с PD-1, PD-L1 или LAG-3.

Согласно связанному аспекту, способ уменьшения или истощения популяции регуляторных Т-клеток в опухоли нуждающегося в этом субъекта включает введение эффективного количества антитела или фрагмента антитела в комбинации со вторым антителом, фрагментом антитела, антагонистом или лекарственным средством таким образом, что происходит снижение количества регуляторных Т-клеток у указанного субъекта.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, субъект страдает клеточным пролиферативным заболеванием или раком, как описано в настоящей заявке.

Согласно другим вариантам реализации изобретения, субъект страдает хронической вирусной инфекцией, воспалительным заболеванием или аутоиммунным заболеванием, как описано в настоящей заявке.

Предоставление двух различных сигналов Т-клеткам является общепринятой моделью активации лимфоцитов для активации покоящихся Т-лимфоцитов антиген-презентирующими клетками (АПК). Данная модель также предусматривает различие "своего" и "чужого" и иммунную толерантность. Первичный, или антиген-специфичный сигнал, передается через Т-клеточный рецептор (T-cell receptor, TCR) после распознавания чужеродного антигенного пептида, презентируемого вместе с молекулой главного комплекса гистосовместимости (major histocompatibility complex, МНС). Второй, или костимулирующий, сигнал доставляется Т-клеткам костимулирующими молекулами, экспрессируемыми на антиген-презентирующих клетках (АПК). Указанный сигнал вызывает содействие Т-клеток клональной экспансии, секреции цитокинов и эффекторной функции. В отсутствие костимуляции Т-клетки могут стать невосприимчивыми к стимуляции антигенами, что приводит к толерогенному ответу на чужеродные или эндогенные антигены.

В модели с двумя сигналами Т-клетки получают как положительные костимулирующие, так и отрицательные коингибирующие сигналы. Регулирование таких положительных и отрицательных сигналов имеет решающее значение для максимизации защитных иммунных ответов хозяина при поддержании иммунной толерантности и предотвращении аутоиммунных реакций. Отрицательные сигналы кажутся необходимыми для индукции толерантности Т-клеток, тогда как положительные сигналы способствуют активации Т-клеток. Как костимулирующие, так и коингибирующие сигналы, подаются на подвергшиеся воздействию антигена Т-клетки, и взаимодействие между указанными костимулирующими и коингибирующими сигналами является важным для контроля силы иммунного ответа. Кроме того, сигналы, передаваемые Т-клеткам, изменяются по мере устранения, усиления или сохранения инфекции или провокации иммунной системы, и эти изменения сильно влияют на реагирующие Т-клетки и изменяют иммунный ответ.

Механизм костимуляции представляет терапевтический интерес, поскольку манипулирование костимулирующими сигналами, как было показано, обеспечивает способ усиления или остановки клеточного иммунного ответа. Недавно было обнаружено, что дисфункция или толерантность Т-клеток может наблюдаться одновременно с индуцированной и устойчивой экспрессией регуляторов иммунных контрольных точек, таких как полипептид запрограммированной клеточной гибели 1 (PD-1) и его лиганды, PD-L1 и PD-L2. Гиперэкспрессия PD-L1 наблюдается при многих раковых заболеваниях и часто связана с плохим прогнозом (Thompson RH et al., *Cancer Res* 2006, 66 (7): 3381). Кроме того, большинство Т-лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, преимущественно экспрессируют PD-1, в отличие от Т-лимфоцитов в нормальных тканях и Т-лимфоцитов периферической крови, что указывает на то, что стимуляция PD-1 на опухолереактивных Т-клетках может вносить вклад в нарушение противоопухолевых иммунных ответов (*Blood* 2009 114 (8): 1537). Это может быть связано с использованием сигналинга PD-L1, опосредованного опухолевыми клетками, экспрессирующими PD-L1, взаимодействующими с Т-клетками, экспрессирующими PD-1, что приводит к ослаблению активации Т-клеток и уклонению от иммунного надзора. Ингибирование взаимодействия PD-L1/PD-1 обеспечивает способ усиления Т-клеточного иммунитета, включая опосредованное CD8⁺ Т-клетками уничтожение раковых клеток и опухолей. Подобное усиление Т-клеточного иммунитета наблюдалось при ингибировании связывания PD-L1 с партнером по связыванию B7-1. Следовательно, терапевтическое нацеливание на PD-1 и другие регуляторы иммунных контрольных точек представляет собой область повышенного интереса.

Комбинирование ингибирования передачи сигналов TIGIT, PD-1, PD-L1 и/или LAG-3 с другими сигнальными путями, регуляция которых нарушена в опухолевых клетках, может обеспечивать способы повышения эффективности лечения. В последние годы был идентифицирован ряд регуляторов иммунных контрольных точек в виде рецепторов и их лигандов. Одним из важных семейств мембраносвязанных лигандов, которые связываются с костимулирующими или коингибирующими рецепторами, является семейство B7, которое включает CTLA-4 и его лиганды, B7-1 и B7-2; PD-1 и его лиганды, PD-L1 (B7-H1) и PD-L2 (B7-DC); B7-H2 (ICOS-L), B7-H3, B7-H4, B7-H5 (VISTA) и B7-H6. Дополнительные антагани-

сты иммунных контрольных точек включают, но не ограничиваются указанными, TIM-3 и его лиганд, галектин-9; LAG-3 и его лиганды, включая лектин синусоидальных эндотелиальных клеток печени (LSECtin) и галектин-3; CD122 и его лиганд CD122R; CD70, B7H3, аттенуатор В- и Т-лимфоцитов (BTLA) и VISTA (Le Mercier et al. (2015) *Front. Immunol.*, (6), Article 418). Кроме того, ряд антагонистов регуляторов контрольных точек был идентифицирован и протестирован на различных клинических и доклинических моделях и/или одобрен Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA) (Kyi et al., *FEBS Letters*, 588: 368-376 (2014) (Kyi et al., *FEBS Letters*, 588:368-376 (2014)). Концепция применения блокады ингибиторных рецепторов, также известная как блокада иммунных контрольных точек, была утверждена, например, на основании одобрения FDA ингибиторов PD-1, ниволумаба и пембролизумаба, а также антитела против CTLA-4, ипилимумаба, для лечения метастатической меланомы.

Антагонист иммунных контрольных точек модулирует или препятствует активности регулятора иммунных контрольных точек таким образом, что в результате его связывания с указанным регулятором контрольных точек или его лигандом происходит блокирование или ингибирование передачи сигналов через рецептор регулятора контрольных точек. Путем ингибирования этой передачи сигналов можно обращать иммуносупрессию таким образом, что Т-клеточный иммунитет, направленный против раковых клеток, может быть восстановлен или усилен. Напротив, агонист иммунных контрольных точек (например, костимулирующая молекула) стимулирует активность регулятора иммунных контрольных точек таким образом, что в результате его связывания с указанным регулятором контрольных точек или его лигандом происходит стимуляция передачи сигналов через рецептор регулятора указанных контрольных точек. Стимуляция указанной передачи сигналов может приводить к восстановлению или усилению Т-клеточного иммунитета, направленного против раковых клеток.

Соответственно, согласно одному варианту реализации изобретения, способ стимуляции иммунного ответа у субъекта включает введение указанному субъекту антитела против TIGIT, антитела против PD-1, антитела против PD-L1, антитела против LAG-3, фрагмента (фрагментов) указанного антитела (например, HCVR и/или LCVR антитела против TIGIT) или биспецифичного противоопухолевого антагониста, описанного в настоящей заявке, в комбинации с другим регулятором иммунных контрольных точек, описанным в настоящей заявке выше, таким образом, что у указанного субъекта происходит стимуляция иммунного ответа, например, для ингибирования роста опухоли или для стимуляции противовирусного ответа.

Согласно одному варианту реализации изобретения, антитело против TIGIT, антитело против PD-1, антитело против PD-L1, антитело против LAG-3, фрагмент (фрагменты) указанного антитела или биспецифичный противоопухолевый антагонист в соответствии с настоящей заявкой вводят в комбинации с другим регулятором иммунных контрольных точек, либо в виде отдельных антител, либо в виде мультиспецифичных антител, обладающих специфичностью связывания с множеством продуктов. Как правило, антитело против TIGIT, антитело против PD-1, антитело против PD-L1, антитело против LAG-3 или биспецифичный противоопухолевый антагонист, описанные в настоящей заявке, можно объединять для стимуляции иммунного ответа с (i) антагонистом белка семейства IgSF, семейства B7 или семейства TNF, которые ингибируют активацию Т-клеток, или антагонистом цитокина, который ингибирует активацию Т-клеток (например, IL-6, IL-10, TGF- β , VEGF или других иммуносупрессорных цитокинов), и или (ii) агонистом стимулирующих рецепторов семейства IgSF, семейства B7 или семейства TNF или цитокинов для стимуляции активации Т-клеток для стимуляции иммунного ответа.

Согласно одному варианту реализации изобретения, субъекту вводят антитело против TIGIT или его фрагменты HCVR и/или LCVR в комбинации с антителом против PD-1 или антагонистом PD-1. Согласно другому варианту реализации изобретения, субъекту вводят антитело против TIGIT или его фрагменты HCVR и/или LCVR в комбинации с антителом против PD-L1 или антагонистом PD-L1. Согласно другому варианту реализации изобретения, субъекту вводят антитело против TIGIT или его фрагменты HCVR и/или LCVR в комбинации с антителом против CTLA-4 или антагонистом CTLA-4.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, для проведения комбинированного лечения антителом против TIGIT, антителом против PD-1, антителом против PD-L1 и/или антителом против LAG-3, его фрагментом или любым из биспецифичных антагонистов согласно настоящему изобретению отбирают исключительно страдающих раком субъектов, у которых наблюдается высокий уровень экспрессии лиганда регулятора иммунных контрольных точек. В качестве примера, согласно одному варианту реализации изобретения, субъект, страдающий раком, у которого наблюдается высокий уровень экспрессии PVR (CD155) и/или нектин-2 (CD112) и/или низкий уровень экспрессии PD-L1, может быть выбран для проведения монотерапии антителами против TIGIT, их фрагментами или антагонистами TIGIT согласно настоящему изобретению или комбинированной терапии вместе с антагонистом PD-1 или другим регулятором иммунных контрольных точек.

Антитело против TIGIT, антитело против PD-1, антитело против PD-L1 можно вводить отдельно от второго антитела, фрагмента антитела или антагониста, или можно вводить мультиспецифичное антитело или антагонист, обладающий по меньшей мере одной специфичностью связывания в отношении TIGIT и второй специфичностью связывания в отношении другого продукта-мишени. Кроме того, антитело

против TIGIT, антитело против PD-1, антитело против PD-L1, антитело против LAG-3 или биспецифичный антагонист в соответствии с настоящей заявкой можно вводить совместно с одним или более дополнительными агентами, например, антителами, антагонистами или лекарственными средствами в количестве (количествах), эффективном для стимуляции иммунного ответа и/или апоптоза, для дополнительно усиления, стимуляции или активации иммунного ответа и/или апоптоза у субъекта.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, антитело против TIGIT, против PD-1, против PD-L1 или против LAG-3 или его фрагмент (фрагменты) вводят после лечения другим противоопухолевым антагонистом. Например, согласно одному варианту реализации изобретения, антитела против TIGIT, против PD-1, против PD-L1 или против LAG-3 можно вводить только после того, как лечение антагонистом PD-1/PD-L1 оказалось неэффективным, привело к неполному терапевтическому ответу, или же произошло повторное возникновение опухоли или рецидив (или "неэффективность PD-1"). Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, раковые заболевания, для которых наблюдается такое неэффективное лечение, могут подвергаться скринингу на предмет экспрессии, например, PVR и/или нектина-2, и только при наличии высокого уровня экспрессии будет проводиться лечение антителом против TIGIT, антителом против PD-1, антителом против PD-L1 или антителом против LAG-3, фрагментом или антагонистом согласно настоящему изобретению.

Согласно одному варианту реализации изобретения, антитело против TIGIT, антитело против PD-1, антитело против PD-L1 или антитело против LAG-3 или его фрагмент (фрагменты) вводят в комбинации с антагонистом PD-1, PD-L1, PD-L2, TIGIT или LAG-3.

Другие антитела против PD-1 включают, но не ограничиваются указанными, ниволумаб (BMS-936558, MDX-1106, OPDIVO™), гуманизованное mAb на основе иммуноглобулина G4 (IgG4) (Bristol-Myers Squibb); пембролизумаб (MK-3475, ламбролизумаб, KEYTRUDA™) (Merck); пидилизумаб (CT-011) (Medivation) и AMP-224 (Merck). Антитела против PD-1 коммерчески доступны, например, от компании ABCAM (AB137132), BIOLEGEND™ (EH12.2H7, RMP1-14) и AFFYMETRIX EBIOSCIENCE (J105, J116, M1H4).

Другие антитела против PD-L1 включают атезолизумаб (MPDL3280A, RG7446), полностью человеческое mAb на основе IgG4 (Genentech/Roche); BMS-936559 (MDX-1105), полностью гуманизованное mAb на основе IgG4 (Bristol-Myers Squibb); MEDI4736, гуманизованное антитело на основе IgG (Medimmune/AstraZeneca); и полностью человеческое моноклональное антитело на основе IgG4 MSB0010718C (Merck, EMD Serono).

Примеры антител против CTLA-4 для использования в соответствии со способами согласно настоящему изобретению включают ипилимумаб, тревализумаб и тремелиумаб.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, противоопухолевый антагонист представляет собой доминантно-негативный белок, направленный против регулятора иммунных контрольных точек. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, доминантно-негативный белок содержит внеклеточный домен, происходящий из члена, выбранного из группы, состоящей из PD-L1, PD-L2, PD-1, B7-1, B7-2, B7H3, CTLA-4, LAG-3, TIM-3, TIGIT, BTLA, VISTA, CD70, и их комбинации. Согласно определенным конкретным вариантам реализации изобретения, указанные внеклеточные домены слиты с константной областью иммуноглобулина или рецептором Fc описанных в настоящей заявке антител. Такие мутанты могут связываться с эндогенным рецептором таким образом, что образуется комплекс, в котором наблюдается сниженная передача сигналов. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, внеклеточный домен слит с константной областью иммуноглобулина или Fc-фрагментом или с мономером в олигомерном белковом комплексе.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, доминантно-негативный антагонист PD-L1 содержит внеклеточный домен PD-1. Примеры доминантно-негативного белка представляют собой AMP-224 (совместно разработанный компаниями Glaxo Smith Kline и Amplimmune), рекомбинантный белок слияния, содержащий внеклеточный домен PD-L2 и Fc-фрагмент человеческого IgG. Согласно другому варианту реализации изобретения, доминантно-негативный антагонист PD-L1 содержит одну или более мутацию (мутации) в PD-1, предотвращающих его способность связываться с PD-L1.

Примеры агонистов регуляторов иммунных контрольных точек включают, но не ограничиваются указанными, членов суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (tumor necrosis factor, TNF), таких как CD27, CD40, OX40, GITR и 4-1BB (CD137), и их лиганды, или членов суперсемейства B7-CD28, включая CD28 и ICOS (CD278). Дополнительные агонисты регуляторов контрольных точек включают CD2, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), CD30, BAFFR, HVEM, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160, B7-H3, CD83-лиганд. Агонисты иммунных контрольных точек могут включать антитела или растворимые агонисты белков слияния, содержащие один или более ко-стимулирующих доменов. Антитела-агонисты включают, но не ограничиваются указанными, mAb против CD40, такие как CP-870 893, люкатумумаб и дацетузумаб; mAb против CD137, такие как урелумаб BMS-663513 и PF-05082566; mAb против OX40; mAb против GITR, такие как TRX518; mAb против CD27, такие как CDX-1127; и mAb против ICOS.

Примеры агонистов GITR включают, например, белки слияния GITR и антитела против GITR (на-

пример, двухвалентные антитела против GITR), такие как, например, белок слияния GITR, описанный в патентах США № 6 111 090 и 8 586 023; европейском патенте № 090505B1, публикации патента США согласно PCT: WO 2010/003118 и 2011/090754. Антитела против GITR описаны, например, в патентах США № 7 025 962, 7 618 632, 7 812 135, 8 388 967 и 8 591 886; европейских патентах № 1947183B1 и 1866339; публикациях согласно PCT WO 2011/028683, WO 2013/039954, WO 2005/007190, WO2007/133822, WO2005/055808, WO99/40196, WO2001/03720, WO99/20758, WO2006/083289, WO2005/115451, WO2011/051726. Примером антитела против GITR является TRX518.

Другое семейство мембраносвязанных лигандов, которые связываются с костимулирующими или коингибирующими рецепторами, представляет собой семейство молекул TNF, которые связываются с когнатными членами семейства рецепторов TNF, включающими CD40 и CD40L, OX-40, OX-40L, CD70, CD27L, CD30, CD30L, 4-1BBL, CD137/4-1BB, TRAIL/Apo2-L, TRAILR1/DR4, TRAILR2/DR5, TRAILR3, TRAILR4, OPG, RANK, RANKL, TWEAKR/Fn14, TWEAK, BAFFR, EDAR, XEDAR, TACI, APRIL, BCMA, LT α R, LIGHT, DcR3, HVEM, VEGI/TL1A, TRAMP/DR3, EDAR, EDA1, XEDAR, EDA2, TNFR1, лимфотоксин α /TNF γ , TNFR2, TNF α , LT β R 1, лимфотоксин α (32, FAS, FASL, RELT, DR6, TROY, NGFR (см., например, Tansey, MG et al. (2009) *Drug Discovery Today*, 14 (23-24): 1082-1088).

Агонисты иммунных контрольных точек или костимулирующие молекулы включают молекулы клеточной поверхности, отличные от рецепторов антигенов или их лигандов, которые необходимы для эффективного иммунного ответа, и включают, но не ограничиваются указанными, молекулы MHC I класса, молекулы MHC II класса, белки рецептора TNF, иммуноглобулин-подобные белки, рецепторы цитокинов, интегрины, сигнальные молекулы активации лимфоцитов (белки SLAM), активирующие рецепторы NK-клеток, BTLA, рецептор Toll-лиганда, OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), 4-1BB (CD137), B7-H3, CDS, ICAM-1, ICOS (CD278), GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM (LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8 альфа, CD8 бета, IL2R бета, IL2R гамма, IL7R альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, CD11d, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, NKG2C, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (тактильный), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a и лиганд, который специфично связывается с CD83.

Согласно одному аспекту, Т-клеточные ответы можно стимулировать комбинацией mAb против TIGIT, mAb против PD-1, mAb против PD-L1 или mAb против LAG-3 согласно настоящему изобретению и одного или более из (i) антагониста белка, который ингибирует активацию Т-клеток (например, ингибиторов иммунных контрольных точек), такого как CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG-3, TIM-3, галектин 9, CEACAM -1, BTLA, CD69, галектин-1, CD113, GPR56, VISTA, 2B4, CD48, GARP, PD-1H, LAIR1, TIM-1, CD96 и TIM-4, и (ii) агониста белка, который стимулирует активацию Т-клеток, такого как B7-1, B7-2, CD28, 4-1BB (CD137), 4-1BBL, ICOS, CD40, ICOS-L, OX40, OX40L, GITR, GITRL, CD70, CD27, CD40, DR3 и CD28H.

Примеры агентов, которые модулируют один из указанных выше белков и могут быть объединены с антителами против TIGIT, антителами против PD-1, антителами против PD-L1 и/или антителами против LAG-3 согласно настоящему изобретению для лечения рака, включают: YERVOY™/ипилимумаб или тремелиумаб (для CTLA-4), галиксимаб (для B7.1), OPDIVO™/ниволумаб/BMS-936558 (для PD-1), пидлизумаб/CT-011 (для PD-1), KEYTRUDA™/пембролизумаб/MK-3475 (для PD-1), AMP224 (для B7-DC/PD-L2), BMS-936559 (для B7-H1), MPDL3280A (для B7-H1), MEDI-570 (для ICOS), AMG557 (для B7H2), MGA271 (для B7H3), IMP321 (для LAG-3), урелумаб/ BMS-663513 и PF-05082566 (для CD137/4-1BB), CDX-1127 (для CD27), MEDI-6383 и MEDI-6469 (для OX40), RG-7888 (для OX40L), атацицепт (для TACI), CP-870893 (для CD40), люкатумумаб (для CD40), дацетузумаб (для CD40) и муромонаб-CD3 (для CD3).

Другие молекулы, которые можно комбинировать с противоопухолевыми антагонистами, описанными в настоящей заявке, для лечения рака, включают антагонисты ингибирующих рецепторов на NK-клетках или агонисты активирующих рецепторов на NK-клетках. Например, антитела-антагонисты TIGIT, PD-1 и/или PD-L1 можно комбинировать с антагонистами KIR (например, лирилумабом, антагонистами CSF-1R, такими как RG7155).

Ускользание опухолей от иммунного надзора организма-хозяина осуществляется с помощью большого количества механизмов. Многие из указанных механизмов можно преодолевать путем инактивации иммуносупрессорных белков, экспрессируемых опухолями. К ним относятся, среди прочего, TGF- β , IL-10 и Fas-лиганд. Антитела к каждому из указанных соединений можно использовать в комбинации с противоопухолевыми антагонистами, описанными в настоящей заявке, для противодействия эффектам иммуносупрессорного агента и содействия иммунным противоопухолевым ответам хозяина.

Другие антитела, которые активируют иммунную реакцию хозяина, можно использовать в комбинации с противоопухолевыми антагонистами, описанными в настоящей заявке. Указанные антитела

включают молекулы на поверхности дендритных клеток, которые активируют функцию ДК и презентацию антигена. Антитела против CD40 способны эффективно замещать активность хелперных Т-клеток и могут использоваться в сочетании с противоопухолевыми антагонистами, описанными в настоящей заявке. Активирующие антитела для костимулирующих Т-клетки молекул, такие как OX-40, CD137/4-1BB и ICOS, также могут обеспечивать повышенный уровень активации Т-клеток.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, противоопухолевые антагонисты, описанные в настоящей заявке, можно вводить совместно с одним или более другими терапевтическими агентами, например, противораковыми агентами, радиотоксическими агентами или иммуносупрессорным агентом. Такое совместное введение может решить проблемы, связанные с развитием лекарственной устойчивости, изменением антигенности опухолевых клеток, обеспечивающим резистентность к антителу, и токсичностью (путем введения более низких доз одного или более агентов).

Описанные в настоящей заявке противоопухолевые антагонисты могут быть связаны с агентом (в виде иммунокомплекса) или могут вводиться отдельно от агента. В последнем случае (раздельное введение) антитело можно вводить до, после или одновременно с агентом или можно вводить совместно с другими известными терапиями, например, с противораковой терапией, например, лучевой терапией. Описанные в настоящей заявке противоопухолевые антагонисты можно вводить совместно с одним или несколькими противораковыми агентами таким образом, чтобы обеспечить синергетическое действие двух противораковых агентов через различные механизмы для достижения цитотоксического эффекта в отношении раковых клеток человека.

Противоопухолевые антагонисты, описанные в настоящей заявке, можно комбинировать с противораковым агентом, таким как алкилирующий агент; антрациклиновый антибиотик; антимаболит; детоксицирующий агент; интерферон; поликлональное или моноклональное антитело; ингибитор EGFR; ингибитор HER2; ингибитор гистондеацетилазы; гормон; ингибитор митоза; ингибитор фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K); ингибитор Akt; ингибитор мишени рапамицина (mTOR) млекопитающих; протеасомный ингибитор; ингибитор поли(АДФ-рибоза)полимеразы (PARP); ингибитор пути Ras/MAPK; агент декластеризации центросом; мультикиназный ингибитор; ингибитор серин/треонинкиназы; ингибитор тирозинкиназы; ингибитор VEGF/VEGFR; таксан или производное таксана, ингибитор ароматазы, антрациклин, лекарственное средство, нацеленное на микротрубочки, лекарственное средство-яд топоизомеразы, ингибитор молекулярной мишени или фермента (например, киназы или протеинметилтрансферазы), аналог цитидина или их комбинация.

Примеры алкилирующих агентов включают, но не ограничиваются указанными, циклофосфамид (Cytosan; Neosar); хлорамбуцил (Leukeran); мелфалан (Alkeran); кармустин (BiCNU); бусульфан (Busulfex); ломустин (CeeNU); дакарбазин (DTIC-Dome); оксалиплатин (Eloxatin); кармустин (Gliadel); ифосфамид (Ifex); мехлорэтамин (Mustargen); бусульфан (Myleran); карбоплатин (Paraplatin); цисплатин (CDDP; Platinol); темозоломид (Temodar); тиотепу (Thioplex); бендамустин (Treanda) или стрептозоцин (Zanosar).

Примеры антрациклиновых антибиотиков включают, но не ограничиваются указанными, доксорубин (Adriamycin); липосомальный доксорубин (Doxil); митоксантрон (Novantrone); блеомицин (Bleomexane); даунорубин (Cembidine); липосомальный даунорубин (DaunoXome); дактиномицин (Cosmegen); эпирубицин (Ellence); идарубин (Idamycin); пликамицин (Mithracin); митомицин (Mutamycin); пентостатин (Nipent) или валрубицин (Valstar).

Примеры антимаболитов включают, но не ограничиваются указанными, фторурацил (Adrucil); капецитабин (Xeloda); гидроксимочевину (Hydrea); меркаптопурин (Purinethol); пеметрексед (Alimta); флударабин (Fludara); неларабин (Arranon); кладрибин (Cladribine Novaplus); клофарабин (Clolar); цитарабин (Cytosar-U); децитабин (Dacogen); липосомальный цитарабин (DepoCyt); гидроксимочевину (Droxia); пралатрексат (Folotyng); флоксуридин (FUDR); гемцитабин (Gemzar); кладрибин (Leustatin); флударабин (Oforta); метотрексат (MTX; Rheumatex); метотрексат (Trexall); тиогуанин (Tabloid); TS-1 или цитарабин (Tarabine PFS).

Примеры детоксицирующих агентов включают, но не ограничиваются указанными, амифостин (Ethyol) или месну (Mesnex).

Примеры интерферонов включают, но не ограничиваются указанными, интерферон альфа-2b (Intron A) или интерферон альфа-2a (Roferon-A).

Примеры поликлональных или моноклональных антител включают, но не ограничиваются указанными, трастузумаб (Herceptin); офатумумаб (Arzerra); бевацизумаб (Avastin); ритуксимаб (Rituxan); цетуксимаб (Erbix); панитумумаб (Vectibix); тозитумумаб/йод 131 тозитумумаб (Bexxar); алемтузумаб (Campath); ибритумумаб (Zevalin; In-111; Y-90 Zevalin); гемтузумаб (Mylotarg); экулизумаб орденосуа (Soliris).

Примеры ингибиторов EGFR включают, но не ограничиваются указанными, гефитиниб (Iressa); лапатиниб (Tykerb); цетуксимаб (Erbix); эрлотиниб (Tarceva); панитумумаб (Vectibix); PKI -166; канертиниб (CI-1033); матузумаб (Emd7200) или ЕКВ-569.

Примеры ингибиторов HER2 включают, но не ограничиваются указанными, трастузумаб (Herceptin); лапатиниб (Tykerb) или АС-480.

Примеры ингибиторов гистондеацетилазы включают, но не ограничиваются ими, вориностат (Zolinza), вальпроевую кислоту, ромидепсин, энтинонат, абексинанат, гивинанат и моцетинанат.

Примеры гормонов включают, но не ограничиваются указанными, тамоксифен (Soltamox; Nolvadex); ралоксифен (Evista); мегестрол (Megace); лейпролид (Lupron; Lupron Depot; Eligard; Viadur); фулвестрант (Faslodex); летрозол (Femara); трипторелин (Trelstar LA; Trelstar Depot); эземестан (Aromasin); гозерелин (Zoladex); бикалутамид (Casodex); анастрозол (Arimidex); флуоксиместерон (Androxу; Halotestin); медроксипрогестерон (Provera; Depo-Provera); эстрамустин (Emcyt); флутамид (Eulexin); то-ремифен (Fareston); дегареликс (Firmagon); нилутамид (Nilandron); абареликс (Plenaxis); или тестолактон (Teslac).

Примеры ингибиторов митоза включают, но не ограничиваются указанными, паклитаксел (Taxol; Onxol; Abraxane); доцетаксел (Taxotere); винкристин (Oncovin; Vincasar PFS); винбластин (Velban); это-позид (Tovorpar, Etoporphos; VePesid); тенипозид (Vumon); иксабепилон (Ixempria); нокодазол; эпотилоны; винорелбин (Navelbine); камптотецин (CPT); иринотекан (Campptosar); топотекан (Nucamtin); амсакрин или ламелларин D (LAM-D).

Примеры ингибиторов фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) включают вортманнин, необратимый ингибитор PI3K, деметоксивиридин, производное вортманнина LY294002, обратимый ингибитор PI3K; BKM120 (Buparlisib); иделагалисид (ингибитор PI3K дельта); дувелисид (IPI-145, ингибитор PI3K дельта и гамма); альпелисид (BYL719), альфа-специфичный ингибитор PI3K; TGR 1202 (ранее известный как RP5264), ингибитор PI3K-дельта для перорального применения и копанлисид (BAY 80-6946), ингибитор PI3K α , преимущественный ингибитор изоформ δ .

Примеры ингибиторов Akt включают, но не ограничиваются указанными, милтефозин, AZD5363, GDC-0068, MK2206, перифозин, RX-0201, PBI-05204, GSK2141795 и SR13668.

Примеры ингибиторов MTOR включают, но не ограничиваются указанными, эверолимус (Afinitor) или темсиролимус (Torisel); рапамуне, ридафоролимус; дефоролимус (AP23573), AZD8055 (AstraZeneca), OSI-027 (OSI), INK-128, BEZ235, PI-103, Torin1, PP242, PP30, Ku-0063794, WAY-600, WYE-687, WYE-354 и CC-223.

Примеры протеасомных ингибиторов включают, но не ограничиваются указанными, бортезомиб (PS-341), иксазомиб (MLN 2238), MLN 9708, деланзомиб (CEP-18770), карфилзомиб (PR-171), YU101, опрозомид (ONX- 0912), маризомид (NPI-0052) и дисуфирам.

Примеры ингибиторов PARP включают, но не ограничиваются указанными, олапариб, инициариб, велапариб, BMN-673, BSI-201, AG014699, АВТ-888, GPI21016, МК4827, INO-1001, CEP-9722, PJ-34, Tiq-A, Phen, PF-01367338 и их комбинации.

Примеры ингибиторов пути Ras/MAPK включают, но не ограничиваются указанными, траметиниб, селуметиниб, кобиметиниб, CI-1040, PD0325901, AS703026, RO4987655, RO5068760, AZD6244, GSK1120212, TAK-733, U0126, MEK162 и GDC-0973.

Примеры агентов декластеризации центросом включают, но не ограничиваются указанными, гризе-офульвин; носкапин, производные носкапина, такие как бромированный носкапин (например, 9-бромоноскапин), восстановленный бромоноскапин (RBN), N-(3-бромбензил)носкапин, аминоноскапин и их водорастворимые производные; CW069; ингибитор-производное фенантридена поли(АДФ-рибоза)полимеразы, PJ-34; N2-(3-пиридилметил)-5-нитро-2-фураимид, N2-(2-тиенилметил)-5-нитро-2-фураимид и N2-бензил-5-нитро-2-фураимид.

Примеры мультикиназных ингибиторов включают, но не ограничиваются указанными, регорафе-ниб; сорафениб (Nexavar); сунитиниб (Sutent); BIBW 2992; E7080; Zd6474; PKC-412; мотесаниб или AP24534.

Примеры ингибиторов серин/треонинкиназ включают, но не ограничиваются указанными, рубокси-стаурин; эрил/засудила гидрохлорид; флавопиридол; селициклиб (CYC202; Roscovitine); SNS-032 (BMS-387032); Pkc412; бриостатин; KAI-9803; SF1126; VX-680; Azd1152; Arty-142886 (AZD-6244); SCIO-469; GW681323; CC-401; CEP-1347 или PD 332991.

Примеры ингибиторов тирозинкиназы включают, но не ограничиваются указанными, эрлотиниб (Tarceva); гефитиниб (Iressa); иматиниб (Gleevec); сорафениб (Nexavar); сунитиниб (Sutent); трастузумаб (Herceptin); бевацизумаб (Avastin); ритуксимаб (Rituxan); лапатиниб (Tykerb); цетуксимаб (Erbix); панигумумаб (Vectibix); эверолимус (Afinitor); алемтузумаб (Campath); гемтузумаб (Mylotarg); темсироли-мус (Torisel); пазопаниб (Votrient); дазатиниб (Sprycel); нилотиниб (Tasigna); ваталаниб (Ptk787; ZK222584); CEP-701; SU5614; MLN518; XL999; VX-322; Azd0530; BMS-354825; SKI-606 CP-690; AG-490; WHI-P154; WHI-P131; AC-220 или AMG888.

Примеры ингибиторов VEGF/VEGFR включают, но не ограничиваются указанными, бевацизумаб (Avastin); сорафениб (Nexavar); сунитиниб (Sutent); ранибизумаб; пегаптаниб или вандетиниб.

Примеры лекарственных средств, нацеленных на микротрубочки, включают, но не ограничиваются указанными, паклитаксел, доцетаксел, винкристин, винбластин, нокодазол, эпотилоны и навельбин.

Примеры лекарственных средств-ядов топоизомеразы включают, но не ограничиваются указанными, тенипозид, этопозид, адриамицин, камптотецин, даунорубин, дактиномицин, митоксантрон, ам-сакрин, эпирубицин и идарубицин.

Примеры таксанов или производных таксана включают, но не ограничиваются указанными, паклитаксел и доцетаксол.

Примеры общих химиотерапевтических, противоопухолевых, антипролиферативных агентов включают, но не ограничиваются указанными, альтретамин (Hexalen); изотретиноин (Accutane; Amnesteem; Claravis; Sotret); третиноин (Vesanoid); азациитидин (Vidaza); бортезомиб (Velcade), аспарагиназу (Elspar); левамизол (Ergamisol); митоган (Lysodren); прокарбазин (Matulane); пегаспарграз (Oncaspar); денилейкин дифтитокс (Ontak); порфимер (Photofrin); альдеслейкин (Proleukin); леналидомид (Revlimid); бексаротен (Targretin); талидомид (Thalomid); темсиролимус (Torisel); триоксид мышьяка (Trisenox); вертепорфин (Visudyne); мимозин (Leucenol); (1M тегафур-0,4М 5-хлор-2,4-дигидроксипиримидин-1М оксонат калия) или ловастатин.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, ингибирование TIGIT, PD-1, PD-L1 и/или LAG-3 комбинируют со стандартными методами лечения рака (например, хирургическим вмешательством, лучевой терапией и химиотерапией). Ингибирование TIGIT, PD-1, PD-L1 и/или LAG-3 можно эффективно комбинировать с химиотерапевтическими режимами. В этих случаях возможно уменьшать дозу вводимого химиотерапевтического реагента. Примером такой комбинации является применение антитела против TIGIT, антитела против PD-1, антитела против PD-L1 или антитела против LAG-3 в комбинации с декарбазином для лечения меланомы. Другим примером такой комбинации является применение антитела против TIGIT, антитела против PD-1, антитела против PD-L1 или антитела против LAG-3 в комбинации с интерлейкином-2 (IL-2) для лечения меланомы. Считается, что ингибирование TIGIT, PD-1, PD-L1 и/или LAG-3 в комбинации с химиотерапией может усиливать апоптоз и повышать презентацию опухолевого антигена для цитотоксического иммунного ответа. Другие синергические комбинированные терапии включают ингибирование TIGIT, PD-1, PD-L1 и/или LAG-3 в результате гибели клеток при использовании в сочетании с облучением, хирургическим вмешательством или гормональной депривацией. Каждый из указанных протоколов создает источник опухолевого антигена в организме хозяина.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, антагонисты регуляторов контрольных точек, описанные в настоящей заявке, можно использовать в мультиспецифичных антагонистах или в комбинации с биспецифичными антителами, направляющими экспрессирующие Fc α - или Fc γ -рецептор эффекторные клетки на опухолевые клетки (см., например, патенты США 5 922 845 и 5 837 243). Биспецифичные антитела можно использовать для нацеливания на два отдельных антигена. Например, биспецифичные антитела против рецептора Fc/опухолевого антигена (например, Her-2/neu) использовали для нацеливания макрофагов на раковые клетки или опухоли. Такое нацеливание может приводить к более эффективной активации опухолеспецифичных ответов. Т-клеточное звено опухолеспецифичных ответов можно усиливать путем ингибирования TIGIT, PD-1, PD-L1 и/или LAG-3. В качестве альтернативы, антиген можно доставлять непосредственно к ДК с использованием биспецифичных антител, которые связываются с опухолевым антигеном и специфичным для дендритных клеток маркером клеточной поверхности.

IV. Нуклеиновые кислоты и клетки-хозяева для экспрессии регулятора контрольных точек

Согласно другому аспекту, настоящее изобретение обеспечивает нуклеиновые кислоты, кодирующие противоопухолевые антагонисты согласно настоящему изобретению, включая тяжелую и легкую цепи, а также векторы экспрессии, содержащие такие нуклеиновые кислоты. В частности, нуклеиновые кислоты кодируют один или более HCDR, LCDR, HCVR и/или LCVR, соответствующих любому из антител, антагонистов или фрагментов, описанных в настоящей заявке.

Таким образом, согласно одному аспекту, настоящее изобретение обеспечивает одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих любые противоопухолевые антагонисты, антитела или их антигенсвязывающие части, как описано в настоящей заявке.

Согласно другому аспекту, настоящее изобретение обеспечивает один или более векторов экспрессии, содержащих одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих любые противоопухолевые антагонисты, антитела или их антигенсвязывающие части, как описано в настоящей заявке.

Согласно другому аспекту, настоящее изобретение обеспечивает клетку-хозяина, трансформированную одним или более векторами экспрессии, содержащими одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих любые противоопухолевые антагонисты, антитела или их антигенсвязывающие части, как описано в настоящей заявке.

Молекула (молекулы) ДНК, кодирующая антигенсвязывающие сайты, может быть выделена и секвенирована из моноклонального антитела, продуцируемого в клетках гибридомы, с использованием стандартных процедур (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфично связываться с генами, кодирующими тяжелую и легкую цепи моноклональных антител).

Альтернативно, аминокислотные последовательности из интересующих иммуноглобулинов могут быть определены путем прямого секвенирования белка, и подходящие кодирующие нуклеотидные последовательности могут быть сконструированы в соответствии с универсальной таблицей кодонов. В других случаях нуклеотидные и аминокислотные последовательности антигенсвязывающих сайтов или другие последовательности иммуноглобулина, включая константные области, шарнирные области и т.п.,

могут быть получены из опубликованных источников, хорошо известных в данной области техники.

Векторы экспрессии, кодирующие конкретный моноспецифичный или биспецифичный противоопухолевый антагонист, можно использовать для синтеза противоопухолевых антагонистов согласно настоящему изобретению в культивируемых клетках *in vitro*, или указанные векторы экспрессии можно непосредственно вводить пациенту для экспрессии противоопухолевого антагониста *in vivo* или *ex vivo*. При использовании в настоящей заявке термин "вектор экспрессии" относится к вирусному или невирусному вектору, содержащему полинуклеотид, кодирующий одну или более полипептидных цепей, соответствующих моноспецифичным или биспецифичным противоопухолевым антагонистам согласно настоящему изобретению в форме, подходящей для экспрессии из полинуклеотида (полинуклеотидов) в клетке-хозяине для получения антител или для непосредственного введения в качестве терапевтического агента.

Последовательность нуклеиновой кислоты "функционально связана" с другой последовательностью нуклеиновой кислоты, когда первая последовательностью находится в функциональной взаимосвязи с последней. Например, ДНК предпоследовательности или сигнального пептида функционально связана с ДНК полипептида, если она экспрессируется в виде препротейна, который участвует в секреции полипептида; промотор или энхансер функционально связан с кодирующей последовательностью, если он влияет на транскрипцию последовательности; или сайт связывания рибосомы функционально связан с кодирующей последовательностью, если он расположен таким образом, что облегчает процесс трансляции. В целом, термин "функционально связанный" означает, что связываемые последовательности ДНК являются смежными, а в случае сигнального пептида - смежными и находятся в одной рамке считывания. Однако энхансеры не обязательно должны быть иметь смежное расположение. Связывание осуществляют путем лигирования по удобным сайтам рестрикции. Если такие сайты отсутствуют, можно использовать синтетические олигонуклеотидные адаптеры или линкеры в соответствии с общепринятой практикой.

Последовательности нуклеиновой кислоты для экспрессии противоопухолевых антагонистов, как правило, содержат аминоконцевую последовательность сигнального пептида, которая удаляется из зрелого белка. Поскольку последовательности сигнального пептида могут влиять на уровни экспрессии, полинуклеотиды могут кодировать любую из различных последовательностей N-концевого сигнального пептида. Специалистам в данной области техники будет очевидно, что конструкция вектора экспрессии может зависеть от таких факторов, как выбор клетки-хозяина для трансформации, желаемый уровень экспрессии белка и т.п.

Описанные выше "регуляторные последовательности" относятся к последовательностям ДНК, необходимым для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности в одном или более организмах-хозяевах. Предполагается, что термин "регуляторные последовательности" включает промоторы, энхансеры и другие элементы контроля экспрессии (например, сигналы полиаденилирования). Регуляторные последовательности включают последовательности, которые направляют конститутивную экспрессию нуклеотидной последовательности во многих типах клеток-хозяев, или последовательности, которые направляют экспрессию нуклеотидной последовательности только в определенных клетках-хозяевах (например, тканеспецифичные регуляторные последовательности). Векторы экспрессии, в целом, содержат последовательности для терминации транскрипции и могут дополнительно содержать один или более элементов, положительно влияющих на стабильность мРНК.

Вектор экспрессии содержит один или более элементов регуляции транскрипции, включая промоторы и/или энхансеры, для направленной экспрессии противоопухолевых антагонистов. Промотор содержит последовательность ДНК, которая инициирует транскрипцию в относительно фиксированном положении по отношению к сайту инициации транскрипции. Промотор содержит коровые элементы, необходимые для базового взаимодействия РНК-полимеразы и факторов транскрипции, и может работать вместе с другими вышерасположенными элементами и элементами ответа.

Следует понимать, что при использовании в настоящей заявке термин "промотор" употребляется в самом широком смысле и включает элементы регуляции транскрипции (TRE) из геномных генов или полученные из них гибридные TRE, включая ТАТА-боксы или элемент инициации для точной инициации транскрипции в присутствии или в отсутствие дополнительных TRE (то есть вышерасположенных активирующих последовательностей, сайтов связывания факторов транскрипции, энхансеров и сайленсеров), которые регулируют активацию или репрессию функционально связанных с ними генов в ответ на онтогенетические и/или внешние стимулы, и транс-действующих регуляторных белков или нуклеиновых кислот. Промотор может содержать геномный фрагмент или гибрид одного или более TRE, объединенных вместе.

Предпочтительными промоторами являются промоторы, способные направлять экспрессию на высоком уровне в интересующей клетке-мишени. Промоторы могут включать конститутивные промоторы (например, HCMV, SV40, фактор элонгации 1α (EF- 1α)) или промоторы, которые предпочтительно экспрессируются в конкретном интересующем типе клеток. Энхансеры в целом относятся к последовательностям ДНК, которые функционируют за пределами сайта инициации транскрипции и могут быть расположены в положении 5' или 3' по отношению к единице транскрипции. Кроме того, энхансеры могут на-

ходиться в пределах интрона, а также в пределах кодирующей последовательности. Обычно они имеют длину от 10 до 300 п.н. и функционируют в цис-положении. Эхансеры повышают и/или регулируют транскрипцию с близлежащих промоторов. Предпочтительными эхансерами являются эхансеры, которые направляют высокий уровень экспрессии в продуцирующей антитело клетке. Специфичные для клеток или тканей регуляторные элементы транскрипции (TRE) могут быть встроены в векторы экспрессии для ограничения экспрессии желаемыми типами клеток. Промоторы Pol III (H1 или U6) являются особо применимыми для экспрессии кшРНК, из которых экспрессируются миРНК. Вектор экспрессии может быть сконструирован для облегчения экспрессии противоопухолевого антагониста в одном или более типах клеток.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, один или более векторов экспрессии могут быть сконструированы для экспрессии как противоопухолевого антагониста, так и одной или более миРНК, нацеленных на путь Tie2, путь VEGF или регулятор иммунных контрольных точек.

Малая интерферирующая РНК (миРНК) представляет собой двухцепочечную РНК, которая может быть сконструирована для индукции специфичного в отношении последовательности посттранскрипционного генного сайленсинга молекул мРНК. Синтетические полученные миРНК структурно имитируют типы миРНК, которые в норме подвергаются в клетках процессингу ферментом Dicer. При экспрессии из вектора указанный вектор экспрессии конструируют для транскрипции короткой двухцепочечной подобной шпильке РНК (кшРНК), которая подвергается процессингу с образованием целевой миРНК внутри клетки. Синтетические миРНК и кшРНК могут быть сконструированы с использованием хорошо известных алгоритмов и могут быть синтезированы с использованием стандартного синтезатора ДНК/РНК.

Для коэкспрессии отдельных цепей противоопухолевого антагониста могут быть встроены подходящие донорные и акцепторные последовательности сплайсинга для экспрессии обоих продуктов. Альтернативно, внутренняя последовательность связывания рибосомы (IRES) или пептидная последовательность 2A может использоваться для экспрессии множества продуктов с одного промотора. IRES обеспечивает структуру, с которой может связываться рибосома, которая не обязательно должна находиться на 5'-конце мРНК. Следовательно, IRES может вызывать инициацию трансляции рибосомой со второго иницирующего кодона в пределах мРНК, обеспечивая продукцию более чем одного полипептида из одной мРНК. Пептид 2A содержит короткие последовательности, опосредующие котрансляционное саморасщепление пептидов, расположенных выше и ниже сайта 2A, что позволяет продукцию двух разных белков из одного транскрипта в эквимоларных количествах. CHYSEL представляет собой неограничивающий пример пептида 2A, который способствует высвобождению эукариотической рибосомой в ходе трансляции растущей полипептидной цепи, которую она синтезирует, без диссоциации от мРНК. Рибосома продолжает трансляцию, производя таким образом второй полипептид.

Вектор экспрессии может включать вирусный вектор или невирусный вектор. Вирусные векторы могут происходить из аденоассоциированного вируса (adeno-associated virus, AAV), аденовируса, вируса герпеса, вируса коревой оспы, полиовируса, поксвируса, ретровируса (включая лентивирус, такой как ВИЧ-1 и ВИЧ-2), вируса Синдбис и других РНК-вирусов, альфавируса, астровируса, коронавируса, ортомиксовируса, паповавируса, парамиксовируса, парвовируса, пикорнавируса, тогавирусов и т.п. Невирусный вектор представляет собой просто "голый" вектор экспрессии, который не упакован с помощью вирусных компонентов (например, капсидов и/или оболочек).

В конкретных случаях указанные векторы могут быть сконструированы для нацеливания на определенные заболевания или популяции клеток путем использования обеспечивающих нацеливание свойств, присущих вирусному вектору или созданных в указанном вирусном векторе. Конкретные клетки могут быть "мишенями" для доставки полинуклеотидов, а также для экспрессии. Таким образом, термин "нацеливание" в данном случае может быть основан на использовании эндогенных или гетерологичных связывающих агентов в форме капсидов, белков оболочки, антител для доставки в определенные клетки, использовании тканеспецифичных регуляторных элементов для ограничения экспрессии конкретной подгруппой (подгруппами) клеток или использовании обоих вариантов.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, экспрессия цепей антитела находится под контролем регуляторного элемента, такого как тканеспецифичный или универсальный промотор. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, универсальный промотор, такой как промотор ЦМВ, промотор гибрида ЦМВ-бета-актин курицы (CAG), тканеспецифичный или опухолеспецифичный промотор может применяться для контроля экспрессии конкретной тяжелой или легкой цепи антитела или его одноцепочечного производного.

Невирусные векторы экспрессии можно использовать для переноса невирусных генов либо путем прямой инъекции "голой" ДНК, либо путем инкапсулирования полинуклеотидов, кодирующих противоопухолевый антагонист, в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, вирусоподобные частицы или безъядерные эритроциты. Такие композиции могут быть дополнительно связаны посредством химической конъюгации с нацеливающими доменами для облегчения направленной доставки и/или проникновения нуклеиновых кислот в желаемые интересующие клетки. Кроме того, плазмидные векторы можно инкубировать с синтетическими молекулами для переноса генов, такими как полимерные ДНК-связывающие катионы типа полилизина, протамина и альбумина, и связывать с нацеленными на клетки лигандами,

такими как асиалооросомукоид, инсулин, галактоза, лактоза или трансферрин.

Альтернативно, может использоваться "голая" ДНК. Эффективность захвата "голой" ДНК может быть улучшена путем компактизации или использования биоразлагаемых латексных шариков. Такая доставка может быть дополнительно улучшена путем обработки гранул с повышением их гидрофобности и, таким образом, облегчением разрушения эндосомы и высвобождения ДНК в цитоплазму.

V. Способы получения моноспецифичных или мультиспецифичных антител

Согласно другому аспекту, настоящее изобретение обеспечивает клетки-хозяева, трансформированные нуклеиновыми кислотами или векторами экспрессии, кодирующими HCVR и/или LCVR антител против TIGIT, антител против PD-1, антител против PD-L1 и/или антител против LAG-3, или нуклеиновыми кислотами/векторами экспрессии, кодирующими моноспецифичный или биспецифичный противоопухолевый антагонист согласно настоящему изобретению. Клетки-хозяева могут представлять собой любую бактериальную или эукариотическую клетку, способную экспрессировать нуклеиновые кислоты или векторы экспрессии, кодирующие HCVR и/или LCVR антител против TIGIT, против PD-1, против PD-L1 и/или против LAG-3, или любые другие совместно вводимые антитела или антагонисты, описанные в настоящей заявке.

Согласно другому аспекту, способ получения противоопухолевого антагониста включает культивирование клетки-хозяина, трансформированной одной или более нуклеиновыми кислотами или векторами экспрессии, кодирующими HCVR и/или LCVR против TIGIT, против PD-1, против PD-L1 и/или против LAG-3, в условиях, которые позволяют продукцию антитела или его фрагмента и очищение указанного антитела из клетки.

Согласно дополнительному аспекту, настоящее изобретение обеспечивает способ получения антитела, включающий культивирование клетки, временно или стабильно экспрессирующей одну или более конструкций, кодирующих одну или более полипептидных цепей антитела; и очистку указанного антитела из культивируемых клеток. Можно использовать любую клетку, способную продуцировать функциональное антитело. Согласно предпочтительным вариантам реализации изобретения, клетка, экспрессирующая антитело, является эукариотической клеткой или происходит из млекопитающего, предпочтительно, представляет собой клетку человека. Для экспрессии антител можно использовать клетки из различных клеточных типов тканей. Согласно другим вариантам реализации изобретения, клетка представляет собой дрожжевую клетку, клетку насекомого или бактериальную клетку. Предпочтительно продуцирующая антитело клетка стабильно трансформирована вектором, экспрессирующим антитело.

Один или более векторов экспрессии, кодирующих тяжелые или легкие цепи антитела, можно встраивать в клетку с помощью любого стандартного метода, такого как метод "голой ДНК", катионная липид-опосредованная трансфекция, опосредованная полимером трансфекция, опосредованная пептидом трансфекция, опосредованная вирусом инфекция, использование физических или химических агентов или обработки, электропорация и т.д. Кроме того, клетки можно трансфицировать одним или более векторами экспрессии для экспрессии антитела вместе с селективируемым маркером, облегчающим селекцию стабильно трансформированных клонов, экспрессирующих антитело. Антитела, продуцируемые такими клетками, можно собирать и/или очищать в соответствии с методами, известными в данной области техники, такими как центрифугирование, хроматография и т.д.

Примеры подходящих селективируемых маркеров для клеток млекопитающих включают дигидрофолатредуктазу (DHFR), тимидинкиназу, неомицин, аналог неомицина G418, гидромицин и пурамицин. Когда такие селективируемые маркеры успешно переносятся в клетку млекопитающего-хозяина, трансформированная клетка млекопитающего-хозяина может выживать при помещении под селективное давление. Существует две широко используемые разные категории режимов селекции. Первая категория основана на клеточном метаболизме и использовании мутантной клеточной линии, у которой отсутствует способность расти независимо от среды с добавками. Двумя примерами являются клетки CHO DHFR и клетки LTK мыши. Эти клетки не способны расти без добавления таких питательных веществ, как тимидин или гипоксантин. Поскольку в этих клетках отсутствуют определенные гены, необходимые для полноценного пути синтеза нуклеотидов, они не могут выжить, если недостающие нуклеотиды не будут помещены в среду с добавками. Альтернативой снабжения среды добавками является введение интактного гена DHFR или TK в клетки, в которых отсутствуют соответствующие гены, изменяя таким образом их потребность в питательных веществах для роста. Отдельные клетки, которые не были трансформированы геном DHFR или TK, будут неспособны выжить в средах без добавок.

Вторая категория представляет собой доминантную селекцию, которая относится к схеме селекции, используемой для любого типа клеток, и не требует использования мутантной клеточной линии. В схемах такой селекции, как правило, используется лекарственное средство для остановки роста клетки-хозяина. Клетки, которые содержат новый ген, будут экспрессировать белок, предоставляющий лекарственную устойчивость, и выживут при селекции. Примеры такой доминантной селекции включают лекарственные средства неомицин, микофеноловую кислоту или гидромицин. Эти три примера используют бактериальные гены под эукариотическим контролем для предоставления устойчивости к подходящему лекарственному средству G418 или неомицину (генетицину), xgpt (микофеноловой кислоте) или гидромицину соответственно. Другие лекарственные средства включают аналог неомицина G418 и пурами-

цин.

Примеры экспрессирующих антитело клеток включают клетки человека Jurkat, клетки почки эмбриона человека 293 (HEK), клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки фибросаркомы мыши WEHI, а также одноклеточные виды простейших, такие как *Leishmania tarentolae*. Кроме того, стабильно трансформированные продуцирующие антитела клеточные линии могут быть получены с использованием первичных клеток, иммортализованных с помощью с-тус или других иммортализирующих агентов.

Согласно одному варианту реализации изобретения, клеточная линия содержит стабильно трансформированную клеточную линию *Leishmania*, такую как *Leishmania tarentolae*. Известно, что *Leishmania* обеспечивают жизнестойкий быстрорастущий одноклеточный хозяин для высокого уровня экспрессии эукариотических белков, имеющих паттерны гликозилирования по типу млекопитающих. Коммерчески доступный набор для экспрессии эукариотических белков в *Leishmania* доступен из компании Jena Bioscience GmbH, Йена, Германия.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, клеточная линия экспрессирует по меньшей мере 1 мг, по меньшей мере 2 мг, по меньшей мере 5 мг, по меньшей мере 10 мг, по меньшей мере 20 мг, по меньшей мере 50 мг, по меньшей мере 100 мг, по меньшей мере 200 мг, по меньшей мере 300 мг, по меньшей мере 400 мг, или по меньшей мере 500 мг антитела/литр культуры.

Антитела согласно настоящему изобретению можно выделять из экспрессирующих антитело клеток после их культивирования и поддержания в любой подходящей культуральной среде, такой как RPMI, DMEM и AIM V[®]. Антитела можно очищать с использованием стандартных методов белковой очистки (например, аффинной очистки, хроматографии и т.д.), включая применение иммуноаффинной очистки на белке А или белке G. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, конструируют антитела для их секреции в супернатанты культур с последующим выделением из указанных супернатантов.

VI. Фармацевтические композиции и способы лечения

Другой аспект настоящего изобретения относится к фармацевтическим композициям и способам лечения клеточного пролиферативного расстройства, такого как рак, хронические инфекции или патологические состояния с нарушением иммунитета. Согласно одному варианту реализации изобретения, фармацевтическая композиция содержит один или более противоопухолевых антагонистов согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, противоопухолевый антагонист (антагонисты) содержит один или более антагонистов регуляторов контрольных точек, таких как Ig против Т-клеток и ингибиторы домена ITIM (TIGIT), ингибиторы PD-1, ингибиторы PD-L1 и ингибиторы LAG-3. Антагонист (антагонисты) представлен вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может содержать одно или более различных антител, одно или более мультиспецифических антител, одно или более иммуноконъюгатов или их комбинацию, как описано в настоящей заявке.

Как описано выше, способы применения фармацевтических композиций, описанных в настоящей заявке, включают введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению.

Можно применять любой подходящий путь или способ введения для обеспечения пациенту терапевтически или профилактически эффективной дозы антитела или антагониста. Примеры путей или способов введения включают парентеральное (например, внутривенное, интраартериальное, внутримышечное, подкожное, внутриопухолевое), пероральное, местное (назальное, трансдермальное, интрадермальное или внутриглазное), слизистое (например, назальное, подъязычное, буккальное, ректальное, вагинальное введение), ингаляцию, внутрилимфатическое, спинномозговое, внутричерепное, внутрибрюшинное, интратрахеальное, внутрипузырное, интратекальное, кишечное, внутрилегочное, внутрилимфатическое, внутриполостное, внутриглазное, внутрисуставное и трансуретральное введение, а также местную доставку с помощью катетера или стента.

Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или антагонист согласно настоящему изобретению, может быть представлена в любом фармацевтически приемлемом носителе (носителях) или вспомогательном веществе (веществах). При использовании в настоящей заявке термин "фармацевтически приемлемый носитель" включает любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и замедляющие абсорбцию агенты и т.д., которые являются физиологически совместимыми. Фармацевтические композиции могут содержать подходящие твердофазные или гелеобразные носители или вспомогательные вещества. Примеры носителей или вспомогательных веществ включают, но не ограничиваются указанными, карбонат кальция, фосфат кальция, различные сахара, крахмалы, производные целлюлозы, желатин и полимеры, такие как полиэтиленгликоли. Примеры фармацевтически приемлемых носителей включают один или более из воды, солевого раствора, фосфатно-солевого буфера, декстрозы, глицерина, этанола и т.д., а также их комбинацию. Во многих случаях предпочтительным является включение в композиции изотонических агентов, например, Сахаров, полиспиртов, таких как маннит, сорбит или хлорид натрия. Фармацевтически приемлемые носители могут дополнительно содержать минимальные количества вспомогательных веществ, таких как увлажняющие или эмульгирующие агенты, консерванты или буферы, которые усиливают срок

мерно 1 мкг/кг массы тела в день до примерно 100 мкг/кг массы тела в день, от примерно 1 мкг/кг массы тела в день до примерно 10 мкг/кг массы тела в день, от примерно 10 мкг/кг массы тела в день до примерно 100 мкг/кг массы тела в день, от примерно 10 мкг/кг массы тела в день до примерно 10 мкг/кг массы тела в день, от примерно 10 мкг/кг массы тела в день до примерно 1 мг/кг массы тела в день, от примерно 10 мкг/кг массы тела в день до примерно 100 мкг/кг массы тела в день, от примерно 100 мкг/кг массы тела в день до примерно 10 мг/кг массы тела в день, от примерно 100 мкг/кг массы тела в день до примерно 10 мг/кг массы тела в день, от примерно 1 мг/кг массы тела в день до примерно 100 мг/кг массы тела в день, от примерно 1 мг/кг массы тела в день до примерно 10 мг/кг массы тела в день, от примерно 10 мг/кг массы тела в день до примерно 100 мг/кг массы тела в день.

Согласно другим вариантам реализации изобретения, противоопухолевый антагонист вводят в дозе, составляющей от 500 мкг до 20 г, каждые три дня или в дозе, составляющей 25 мг/кг массы тела, каждые три дня.

Согласно другим вариантам реализации изобретения, каждый противоопухолевый антагонист вводят в диапазоне от примерно 10 нг до примерно 100 нг на отдельное введение, от примерно 10 нг до примерно 1 мкг на отдельное введение, от примерно 10 нг до примерно 10 мкг на отдельное введение, от примерно 10 нг до примерно 100 мкг на отдельное введение, от примерно 10 нг до примерно 1 мг на отдельное введение, от примерно 10 нг до примерно 10 мг на отдельное введение, от примерно 10 нг до примерно 100 мг на отдельное введение, от примерно 10 нг до примерно 1000 мг на инъекцию, от примерно 10 нг до примерно 10,000 мг на отдельное введение, примерно 100 нг до примерно 1 мкг на отдельное введение, примерно 100 нг до примерно 10 мкг на отдельное введение, примерно 100 нг до примерно 100 мкг на отдельное введение, примерно 100 нг до примерно 1 мг на отдельное введение, примерно 100 нг до примерно 10 мг на отдельное введение, примерно 100 нг до примерно 100 мг на отдельное введение, примерно 100 нг до примерно 1000 мг на инъекцию, примерно 100 нг до примерно 10,000 мг на отдельное введение, примерно 1 мкг до примерно 10 мкг на отдельное введение, примерно 1 мкг до примерно 100 мкг на отдельное введение, примерно 1 мкг до примерно 1 мг на отдельное введение, примерно 1 мкг до примерно 10 мг на отдельное введение, примерно 1 мкг до примерно 100 мг на отдельное введение, примерно 1 мкг до примерно 1000 мг на инъекцию, примерно 1 мкг до примерно 10,000 мг на отдельное введение, примерно 10 мкг до примерно 100 мкг на отдельное введение, примерно 10 мкг до примерно 10 мг на отдельное введение, примерно 10 мкг до примерно 100 мг на отдельное введение, примерно 10 мкг до примерно 1000 мг на инъекцию, примерно 10 мкг до примерно 10,000 мг на отдельное введение, примерно 100 мкг до примерно 1 мг на отдельное введение, примерно 100 мкг до примерно 10 мг на отдельное введение, примерно 100 мкг до примерно 100 мкг на отдельное введение, примерно 100 мкг до примерно 1000 мг на инъекцию, примерно 100 мкг до примерно 10,000 мг на отдельное введение, примерно 1 мг до примерно 10 мг на отдельное введение, примерно 1 мг до примерно 100 мг на отдельное введение, примерно 1 мг до примерно 1000 мг на инъекцию, примерно 1 мг до примерно 10,000 мг на отдельное введение, примерно 10 мг до примерно 100 мг на отдельное введение, примерно 10 мг до примерно 1000 мг на инъекцию, примерно 10 мг до примерно 10,000 мг на отдельное введение, примерно 100 мг до примерно 1000 мг на инъекцию, примерно 100 мг до примерно 10,000 мг на отдельное введение и примерно 1000 мг до примерно 10,000 мг на отдельное введение. Противоопухолевый антагонист можно вводить каждый день, каждые 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней или каждые 1, 2, 3 или 4 недели.

Согласно другим конкретным вариантам реализации, противоопухолевый антагонист можно вводить в дозе, составляющей примерно 0,0006 мг/день, 0,001 мг/день, 0,003 мг/день, 0,006 мг/день, 0,01 мг/день, 0,03 мг/день, 0,06 мг/день, 0,1 мг/день, 0,3 мг/день, 0,6 мг/день, 1 мг/день, 3 мг/день, 6 мг/день, 10 мг/день, 30 мг/день, 60 мг/день, 100 мг/день, 300 мг/день, 600 мг/день, 1000 мг/день, 2000 мг/день, 5000 мг/день или 10,000 мг/день. Ожидается, что доза будет зависеть от заболевания, массы тела, возраста и состояния здоровья пациента.

Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, кодирующие последовательности для противоопухолевого антагониста включены в подходящий вектор экспрессии (например, вирусный или невирусный вектор) для экспрессии эффективного количества указанного противоопухолевого антагониста у пациента, страдающего клеточным пролиферативным расстройством. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, включающим введение, например, одного или более рекомбинантных вирусов AAV (гAAV), фармацевтическая композиция может содержать гAAV в количестве, включающем по меньшей мере 10^{10} , по меньшей мере 10^{11} , по меньшей мере 10^{12} , по меньшей мере 10^{13} , или по меньшей мере 10^{14} геномных копий (GC) или рекомбинантных вирусных частиц на кг или любой их диапазон. Согласно конкретным вариантам реализации изобретения, фармацевтическая композиция содержит эффективное количество рекомбинантного вируса, такого как гAAV, в количестве, содержащем по меньшей мере 10^{10} , по меньшей мере 10^{11} , по меньшей мере 10^{12} , по меньшей мере 10^{13} , по меньшей мере 10^{14} , по меньшей мере 10^{15} геномных копий или геномных копий рекомбинантных вирусных частиц на субъекта, или любой их диапазон.

Дозы можно тестировать на нескольких принятых в данной области техники животных моделях,

подходящих для любого конкретного клеточного пролиферативного расстройства.

Методы доставки также могут включать применение поликатионной конденсированной ДНК, связанной или несвязанной с убитыми вирусами, связанной с лигандом ДНК, липосом, клеток-носителей для доставки в эукариотические клетки, осаждения фотополимеризованных гидрогелевых материалов, ручной генной пушки для переноса генов, ионизирующего излучения, нейтрализации заряда нуклеиновых кислот или слияния с клеточными мембранами, опосредованного частицами переноса генов и т.д.

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано с помощью следующих далее примеров, которые не ограничивают настоящее изобретение. Содержание всех ссылок, патентов и опубликованных патентных заявок, цитированных на протяжении настоящей заявки, в также фигуры и таблицы включены в настоящую заявку посредством ссылки.

Примеры

Пример 1: Создание моноклональных антител

Моноклональные антитела (mAb) согласно настоящему изобретению создавали и подвергали скринингу с использованием методов, хорошо известных в данной области техники, см., например, Harlow and Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, New York. Антигенспецифичные гибридомные mAb клонировали, секвенировали и конструировали с использованием методов, хорошо известных в данной области техники, см., например, Lo. В.К.С *Methods in Molecular Biology*TM. Volume 248 2004. *Antibody Engineering*.

На фиг. 1 показаны последовательности CDR mAb против TIGIT. На фиг. 2A-2B показаны несколько вариантов реализации последовательностей варибельного домена антитела против TIGIT. На фиг. 3 показаны последовательности CDR mAb против PD-1. На фиг. 4A-4C показаны несколько вариантов реализации последовательностей варибельного домена антитела против PD-1. На фиг. показаны последовательности CDR mAb против PD-L1. На фиг. 6A-6C показаны несколько вариантов реализации последовательностей варибельного домена антитела против PD-L1.

Пример 2: Дизайн биспецифичных антител против PD-1 с scFv против TIGIT

На фиг. 7A-7C показаны три примера биспецифичных противоопухолевых антагонистов, Vi-TPM-93 (фиг. 7A), Vi-TPM-94A (фиг. 7B) и Vi-TPM-94B (фиг. 7C). Указанные антагонисты содержат каркас антитела против PD-1 (PD-01) (фиг. 7A) или каркас антитела против PD-1 (PD-06/2P17) (фиг. 7A, 7B), а также scFv против TIGIT с варибельными областями тяжелой цепи и легкой цепи из mAb против TIGIT T-10/B21, разделенными линкером 3xG4S (фиг. 7A, 7B) или линкером 6xG4S (фиг. 7C).

На фиг. 8 показаны последовательности функционального домена, присутствующие в биспецифичном антителе, изображенном на фиг. 7A-7C.

На фиг. 9A-9B показаны примеры последовательностей тяжелой цепи (HC) и легкой цепи (LC), соответствующих биспецифичным антителам, изображенным на фиг. 7A-7C.

Пример 3: Экспрессия и функциональная характеристика биспецифичных антител против PD-1/TIGIT

Для оценки способности Vi-TPM-93 и Vi-TPM-94A блокировать PD-1 проводили анализ IC50 PD-1, в котором биспецифичные mAb в серийных разведениях инкубировали при температуре 4°C в течение 30 мин с клетками CHO-K1, трансфицированными PD-1 человека, и 7 мкг/мл FITC-меченного белка PD-L1-Fc человека, с последующей отмывкой и фиксацией клеток перед анализом с помощью системы iQue intellicyt. Результаты указанного анализа на фиг. 10 показывают, что Vi-TPM-94, содержащий последовательности VH и VL из PD-06/2P17, блокирует взаимодействие между PD-1 и его лигандом PD-L1 лучше (IC50 = 0,15 нМ), чем Vi-TPM-93, содержащий последовательности VH и VL из PD-01 (IC50 = 0,83 нМ).

На фиг. 11 показан анализ с помощью ПААГ-электрофореза в невозобновляющих условиях, демонстрирующий активную временную экспрессию как Vi-TPM-94A, так и Vi-TPM-94B в клетках почки эмбриона человека 293 (HEK).

Для оценки степени гомогенности по составу образцов антагонистов, соответствующих Vi-TPM93, Vi-TPM-94A и Vi-TPM-94B, указанные образцы очищали и подвергали анализу с помощью ультраэффективной эксклюзионной жидкостной хроматографии (SE-UHPLC). Очистку образцов проводили следующим образом: сначала собранные жидкости культур клеток (HCCF) фильтровали через фильтр с размером пор 0,2 мкм с последующей аффинной очисткой с использованием хроматографии на основе белка A Nitrap Protein A HP (GE Healthcare) со скоростью 1 мл/мин. После аффинной очистки материал подвергали катионообменной хроматографии (CEX) с использованием колонок Serax Proteomix® SCX-NP5 с градиентным элюированием при скорости 0,8 мл/мин. Количество агрегированных (высокомолекулярных, HMW), димерных и низкомолекулярных (LMW) фрагментов определяли с помощью метода SE-UPLC с использованием колонок Tosoh TSKgel UP-G3000SWXL.

Результаты данного анализа (фиг. 12) неожиданно выявили некоторую степень гетерогенности по составу образцов Vi-TPM 93 и Vi-TPM-94A, которая устранялась модификацией линкера в Vi-TPM-94B, то есть увеличением длины линкера с 3xG4S до 6xG4S.

Для оценки аффинности и кинетики связывания Vi-TPM-94A, Vi-TPM-94B и исходного эталонного mAb против PD-1 (BM) с His-меченым PD-1 человека проводили биослойную интерферометрию с ис-

пользованием системы Octet RED96 (ForteBio). Вкратце, 20 нМ биспецифичного антагониста нагружали на биосенсоры захвата, направленные против человеческого IgG. За ассоциацией анализатора (His-меченного человеческого белка PD-1 или His-меченного человеческого белка TIGIT) наблюдали путем помещения на 5 минут биосенсоров в лунки, содержащие His-меченный PD-1 или His-меченный TIGIT в серийных разведениях. Диссоциацию измеряли после переноса биосенсоров в чистый кинетический буфер и отслеживания интерферометрического сигнала в течение 10 минут. Наблюдаемые скорости ассоциации и диссоциации (K_a и K_d) нормировали с использованием общей модели связывания 1:1, включающей по меньшей мере 5 исследуемых концентраций, с последующим расчетом равновесной константы связывания K_D .

Результаты указанного анализа на фиг. 13А показывают, что аффинность связывания Vi-TRM-94А и Vi-TRM-94В с PD-1 превышает аффинность связывания эталонного антитела против PD-1 с PD-1. Подобным образом, на фиг. 13В показано, что аффинность связывания Vi-TRM-94А и Vi-TRM-94А с TIGIT превышает аффинность связывания эталонного антитела против TIGIT с TIGIT.

Анализ блокирования с использованием клеток CHO, стабильно экспрессирующих TIGIT, и 1 мкг/мл биотинилированного PVR- μ Fc использовали для сравнения способности Vi-TRM-94А и Vi-TRM-94В блокировать связывание TIGIT с лигандом TIGIT PVR. Вкратце, клетки инкубировали с биотинилированным PVR-Fc и молекулами Vi-TRM, промывали и выявляли связанный PVR- μ Fc с помощью PE-конъюгированного стрептавидина с использованием системы iQue Intellicyt. На фиг. 14А показано, что обе молекулы сходным образом блокируют связывание TIGIT и PVR. Подобным образом, обе молекулы могут блокировать связывание PD-1 с его лигандом PD-L1 (фиг. 14В). Результаты указанного анализа также показали, что значения IC₅₀ для Vi-TRM-94А и Vi-TRM-94В немного лучше соответствующих значений для эталонных антител (BM) против TIGIT и PD-1.

Для оценки способности Vi-TRM-94А и Vi-TRM-94В одновременно связывать PD-1 и TIGIT 96-луночные планшеты для ИФА, покрытые huPD-1-Fc (5 мкг/мл), блокировали 1% бычьим сывороточным альбумином (БСА) в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) и инкубировали в течение 2 часов с биспецифичными антителами против PD-1/TIGIT в серийных разведениях с последующим добавлением His-меченного белка huTIGIT и инкубацией в течение 2 часов. После промывки добавляли конъюгированные с HRP антитела против His-метки и ТМВ-субстрат в качестве выявляющих агентов и проводили количественную оценку с помощью многорежимного планшетного ридера Perkin Elmer. Результаты этого анализа на фиг. 15 показывают одновременное связывание PD-1 и TIGIT антагонистами Vi-TRM-94А и Vi-TRM-94В.

Для оценки способности Vi-TRM-94В вызывать продукцию IFN- γ , 250000 человеческие МКПК, полученные от доноров, подвергавшихся скринингу на реактивность в отношении антигена ЦМВ, т.е. донора 287 (фиг. 16А) и донора 401 (фиг. 16В), стимулировали лизатами инфицированных ЦМВ клеток в концентрации 0,1 мкг/мл для стимуляции ЦМВ-реактивных Т-клеток (дорожки 2-7) или не стимулировали лизатами инфицированных ЦМВ клеток (дорожка 1). Клетки Shp-77 сокультивировали с МКПК для обеспечения окружения, подавляющего иммунитет, и затем инкубировали с человеческим IgG (дорожка 3), исходным mAb против TIGIT B21-35 (дорожка 4), исходным mAb против PD-1 2P17 (дорожка 5), исходным mAb против TIGIT B21-35 в комбинации с исходным mAb против PD-1 2P17 (дорожка 6) или Vi-TRM-94В (дорожка 7). Через 5 дней исследовали продукцию IFN- γ в супернатантах клеточных культур с помощью ИФА.

Результаты указанного анализа на фиг. 16А-16В демонстрируют повышенную секрецию IFN- γ в МКПК человека (донор 287, фиг. 16А; донор 401, фиг. 16В) в присутствии Vi-TRM-94В по сравнению с моноспецифичными исходными mAb или комбинацией моноспецифичных исходных антител против PD-1 и против TIGIT, а также отрицательными контролями.

Чтобы оценить способность Vi-TRM-94В индуцировать пролиферацию Т-клеток, 250000 МКПК человека от донора 287 (фиг. 17А) и донора 401 (фиг. 17В) стимулировали 0,1 мкг/мл лизатов инфицированных ЦМВ клеток в течение 2 дней для стимуляции ЦМВ-реактивных Т-клеток, а затем метили сукцинимидиловым эфиром карбоксифлуоресцеина (CFSE). После этого CFSE-меченные МКПК сокультивировали с клетками Shp-77 для обеспечения окружения, подавляющего иммунитет, и дополнительно инкубировали с человеческим IgG (дорожка 1), исходным mAb против TIGIT B21-35 (дорожка 2), исходным mAb против PD-1 2P17 (дорожка 3), исходным mAb против TIGIT B21-35 в комбинации с исходным mAb против PD-1 2P17 (дорожка 4) или Vi-TRM-94В (дорожка 5). Через 5 дней сигнал CFSE на CD3⁺ Т-клетках анализировали с помощью системы iQue intellicyt и рассчитывали индекс пролиферации на основе потери сигнала CFSE.

Результаты этого анализа на фиг. 17А-17В показывают, что Vi-TRM-94В усиливал пролиферацию первичных человеческих Т-клеток из МКПК донора 287 (фиг. 17А) и МКПК из донора 401 (фиг. 17В) в большей степени по сравнению с использованием отдельных антител против PD-1 и против TIGIT или их комбинации, а также отрицательными контролями.

Для оценки фармакокинетических свойств Vi-TRM-94А и Vi-TRM-94В *in vivo* был получен фармакокинетический профиль. Вкратце, 10 мг/кг Vi-TRM-94А или Vi-TRM-94В вводили внутривенно в хво-

стовую вену самкам мышей CD1 в возрасте 6-10 недель (n=2 мыши). Сыворотку собирали через 3 минуты, 3 часа, 1 день, 3 дня, 7 дней и 10 дней после инъекции. Для выявления антител в сыворотке 96-луночные планшеты для ИФА покрывали P(ab')₂-фрагментом козьих антител (Fc-специфичных) против человеческого IgG (Sigma, #SAB3701274) в концентрации 5 мкг/мл, а затем блокировали 5% молоком в ФСБ. После этапа блокирования осуществляли серийное разведение мышьиной сыворотки и очищенных молекул Vi-TRM-94A или Vi-TRM-94B (в качестве стандартов) в 5% молоке, а затем добавляли в планшет и инкубировали в течение 2 часов. После инкубирования лунки промывали и затем инкубировали в присутствии конъюгированных с пероксидазой мышьиных антител AffiniPure против IgG человека, специфичных в отношении Fcγ-фрагмента (Jackson ImmunoResearch #209-035-098), и раствора ТМВ-субстрата для ИФА (Thermo Scientific # 34029) и проводили количественную оценку на основе сигнала OD650 с помощью многорежимного планшетного ридера Perkin Elmer.

Результаты этого анализа на фиг. 18 показали, что период полувыведения (T_{1/2}) биспецифичных антагонистов Vi-TRM-94A и Vi-TRM-94B составлял 7-10 дней. Таким образом, молекулы Vi-TRM-94A и Vi-TRM-94B обладают улучшенным свойством связывания с более высокой аффинностью по сравнению с Vi-TRM-93, а Vi-TRM-94B с удлиненным линкером G4S в scFv-фрагменте антитела против TIGIT обладает дополнительным преимуществом по сравнению с Vi-TRM-93 и Vi-TRM-94A с точки зрения гомогенности.

Пример 4: Идентификация и функциональная характеристика моноклональных антител против LAG-3

Согласно другому аспекту, настоящая заявка относится к скринингу и характеристике моноклональных антител или их антигенсвязывающих частей, которые специфично связываются с человеческим регулятором иммунных контрольных точек, LAG-3. На фиг. 19A показаны последовательности CDR1, CD2 и CDR3 тяжелой цепи, соответствующие выделенным mAb против LAG-3 2L2A.1, 2L2A.6, 2L27B и 3L1A. На фиг. 19B показаны последовательности CDR1, CD2 и CDR3 легкой цепи, соответствующие mAb против LAG-3 2L2A.1, 2L2A.6, 2L27B и 3L1A. На фиг. 20 показаны последовательности VH и VL mAb против LAG-3 2L2A.1, 2L2A.6, 2L27B и 3L1A.

Для того, чтобы показать, что mAb 2L2A и 2L27B (фиг. 21A) и 2L37A и 3L1A (фиг. 21B) блокируют взаимодействие между LAG-3 человека и его главным лигандом, антигеном II класса главного комплекса гистосовместимости (МНС II), экспрессируемым на клетках Raji, проводили анализ блокирования. Вкратце, готовили 2-кратные серийные разведения mAb 2L2A и 2L27B (фиг. 21A) и 2L37A и 3L1A (фиг. 21B). mAb в серийных разведениях и LAG-3-huFc человека инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре, а затем добавляли к клеткам Raji и дополнительно инкубировали в течение 30 минут на льду. Затем клетки Raji промывали и связывание LAG-3-huFc с клетками Raji выявляли с помощью антител PE против человеческого IgG. Клетки фиксировали перед анализом с помощью системы iQue Intellicyt. Результаты указанного анализа на фиг. 21A-21B подтверждают способность мышьиных mAb против LAG-3 блокировать взаимодействие между LAG-3 и его основным лигандом, антигеном II класса главного комплекса гистосовместимости (МНС II), в степени, сравнимой с эталонным mAb против LAG-3 (BM).

Описанный выше анализ блокирования дополнительно использовали для расчета значений IC₅₀, отражающих ингибирование антителами против LAG-3 связывания LAG-3 с МНС II, в частности, гуманизированным вариантом антитела против LAG-3, 2L2A.1, эталонным антителом против LAG-3 (BM, BMS-986016, Bristol-Myers Squibb) и гибридным антителом 2L2A, содержащим CDR мыши 2L2A в человеческом Ig.

Результаты указанного анализа на фиг. 22 показывают, что гуманизированное mAb 2L2A.1 против LAG-3 является более эффективным блокатором, чем mAb BM и гибридное антитело 2L2A, содержащее CDR мыши 2L2A в человеческом Ig, как видно на основании полученного более низкого значения IC₅₀.

Для оценки аффинности и кинетики связывания mAb против LAG-3 2L2A.1 с His-меченным LAG-3 человека проводили биослойную интерферометрию с использованием системы Octet RED96 (ForteBio) по существу, как описано выше в примере 3, со ссылкой на фиг. 13A-13B, как определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR), вместе с соответствующими константами аффинности. На фиг. 23A показана аффинность связывания гуманизированного антитела 2L2A.1 с His-меченным LAG-3 человека. Подобным образом, на фиг. 23B показаны константы аффинности связывания для связывания гуманизированного антитела 2L2A.1 с человеческим LAG-3, слитым с IgG2a мыши (huLAG-3-mIgG2a).

Для дополнительной оценки способности 2L2A.1 связываться с LAG-3 человека к клеткам CHO-K1 (20000 клеток/лунку), экспрессирующим человеческий LAG-3, добавляли 2L2A.1 или эталонное антитело (BM) против LAG-3 в серийных разведениях. Смеси инкубировали при 4°C в течение 20 мин, промывали 3 раза и окрашивали вторичными антителами - PE-меченным F(ab')₂-фрагментами козьих антител против Fc-фрагмента человеческого IgG (Thermo Scientific # H10104) - путем инкубирования при 4°C в течение 20 мин. Клетки промывали и ресуспендировали в растворе 7AAD и фиксировали в 10% нейтральном забуференном растворе формалина в течение 15 минут перед анализом с помощью системы iQue Intellicyt. Также были определены соответствующие значения EC₅₀, отражающие полумаксимальные эффективные концентрации (EC₅₀), которые вызывают эффект, соответствующий среднему значению

нию между исходным уровнем и максимальным эффектом в отношении связывания человеческого LAG-3. Как показано на фиг. 24, результаты демонстрируют, что 2L2A.1 обладает более высокой аффинностью связывания с человеческим LAG-3 по сравнению с антителом BM.

На фиг. 25 показан анализ с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в неденатурирующих условиях, демонстрирующий высокий уровень экспрессии гуманизированного варианта mAb против LAG-3 2L2A.1 в клетках 293 эмбриональной почки человека (HEK) с временной экспрессией по сравнению с контрольным (ctrl) антителом.

Для оценки коэкспрессии LAG-3 и PD-1 в активированных человеческих CD3⁺ Т-клетках проводили FACS-анализ на донорских МКПК, активированных антителами против CD3/CD28 человека. Результаты этого анализа, показанные на фиг. 26, подтвердили коэкспрессию LAG-3 и PD-1 в человеческих МКПК, активированных стафилококковым энтеротоксином В (SEB).

Для оценки способности 2L2A.1 индуцировать продукцию IFN- γ 100000 МКПК человека от двух доноров, т.е. донора 0105 (фиг. 27А) и донора 0817 (фиг. 27В), высевали на 96-луночный планшет для ИФА. МКПК либо не стимулировали (дорожка 1), либо стимулировали 0,5 мкг/мл стафилококкового энтеротоксина В (SEB; дорожки 2-4). К стимулированным клеткам добавляли эталонное mAb против LAG-3 (BM) (дорожка 3), mAb 2L2A.1 (дорожка 4) или изотипически сходные контрольные антитела (дорожка 2) и инкубировали при 37°C в течение 5 дней. Затем продукцию IFN- γ исследовали в супернатантах клеточных культур с помощью ИФА. Результаты на фиг. 27А-27В демонстрируют повышенную секрецию IFN- γ в человеческих МКПК от обоих доноров в присутствии 2L2A.1 по сравнению с BM против LAG-3.

На МКПК от 3 дополнительных доноров - донора 223 (фиг. 28А), донора 224 (фиг. 28В) и донора 225 (фиг. 28С) - был проведен аналогичный анализ, в котором дополнительно оценивали пролиферацию МКПК. Результаты на фиг. 28А-28В дополнительно демонстрируют повышенную секрецию IFN- γ в человеческих МКПК из доноров в присутствии 2L2A.1 по сравнению с BM против LAG-3. Для оценки пролиферации МКПК от 3 доноров метили CFSE, стимулировали 100 нг/мл SEB и добавляли эталонные mAb против LAG-3 (BM) (дорожка 3), mAb 2L2A.1 (дорожка 4) или изотипически сходные контрольные антитела (дорожка 2). Смеси МКПК инкубировали при 37°C в течение 5 дней и проводили количественную оценку потери сигнала CFSE на CD4 Т-клетках с помощью FACS для получения индекса пролиферации. Результаты, показанные на фиг. 29А и 29В, демонстрируют, что 2L2A.1 может вызывать более высокую пролиферацию первичных Т-клеток по сравнению с эталонным mAb против LAG-3 (BM).

Пример 5: Дизайн и функциональная характеристика биспецифичного антагониста антитело против LAG-3/scFv против TIGIT

На основании дизайна и характеристики биспецифичного антагониста антитело против PD-1/scFv против TIGIT, описанного в примере 1, было интересно оценить возможность использования преимуществ в технологичности и функциональности данной конструкции в аналогичном биспецифичном дизайне антитела против LAG-3/scFv против TIGIT. На фиг. 30А-30В показаны два примера биспецифичных противоопухолевых антагонистов - Bi-LT-1 с удлиненным линкером 4xG4S в scFv (фиг. 30А) и Bi-LT-3 с удлиненным линкером 6xG4S в scFv (фиг. 30В). На фиг. 31 представлен обобщенный порядок расположения функциональных доменов в биспецифичных антагонистах, изображенных на фиг. 30А-30В. На фиг. 32 показаны аминокислотные последовательности тяжелой цепи (HC) и легкой цепи (LC), соответствующие биспецифичным антагонистам, изображенным на фиг. 30А-30В.

Для оценки способности биспецифичных противоопухолевых антагонистов Bi-LT-1 и Bi-LT-3 блокировать взаимодействие между TIGIT и его лигандом, PVR человека (CD155), и дополнительно блокировать взаимодействие между LAG-3 и его основным лигандом, антигеном II типа главного комплекса гистосовместимости (MHC II), проводили клеточные анализы блокирования, как следует далее.

Вкратце, чтобы показать, что Bi-LT-1 и Bi-LT-3 могут блокировать взаимодействие между TIGIT и его лигандом, PVR человека (CD155), был проведен клеточный анализ блокирования, в котором Bi-LT-1, Bi-LT-3 или Bi-TRM-94B (описанные в примере 1, выше) в серийных разведениях инкубировали с клетками CHO-K1, трансфицированными человеческим TIGIT, и комплексом CD155/PVR-мышинный IgG2a в течение 30 минут на льду. Связывание комплекса CD155/PVR-мышинный IgG2a с клетками CHO-K1 выявляли с помощью PE-меченных антител против IgG мыши. Клетки фиксировали перед анализом с помощью системы iQue intellicyt. Результаты указанного анализа представлены на фиг. 33А и демонстрируют, что Bi-LT-1 и Bi-LT-3 с удлиненными линкерами в scFv сохраняют свою биоактивность в отношении TIGIT.

Чтобы показать, что биспецифичные противоопухолевые антагонисты Bi-LT-1 и Bi-LT-3 могут также блокировать взаимодействие между LAG-3 и его основным лигандом, антигеном II класса главного комплекса гистосовместимости (MHC II), проводили клеточный анализ блокирования, в котором Bi-LT-1, Bi-LT-3 или эталонное антитело против LAG-3 (BM) в серийных разведениях инкубировали с комплексом LAG-3-мышинный IgG2a в течение 30 минут при комнатной температуре, добавляли к клеткам Raji и дополнительно инкубировали в течение 30 минут на льду. Затем клетки Raji промывали, и связывание LAG-3-мышинный IgG2a с клетками Raji выявляли с помощью PE-конъюгированных антител про-

тив IgG мыши. Клетки фиксировали перед анализом с помощью системы iQue intellicyt. Результаты этого анализа представлены на фиг. 33B и указывают на то, что Vi-LT-1 и Vi-LT-3 сохраняют свою биоактивность в отношении LAG-3, подобную эталонному антителу против LAG3. Данные анализа дополнительно использовали для расчета представленных значений IC50 (нМ), которые были сопоставимы со значением IC50 для эталонного антитела против LAG-3 (BM). Результаты на фиг. 33A и 33B вместе демонстрируют, что Vi-LT-1 и Vi-LT-3 сохраняют свою биологическую активность как в отношении TIGIT, так и в отношении LAG-3.

Для оценки способности Vi-LT-1 и Vi-LT-3 одновременно связываться с LAG-3 и TIGIT, на планшет для ИФА наносили LAG-3-mIgG в концентрации 5 мкг/мл и инкубировали при 4°C в течение ночи, а затем блокировали перед добавлением LT-1, LT-3 или исходного mAb против LAG-3 в серийных разведениях. После инкубирования в течение 1 часа при комнатной температуре планшет промывали, добавляли 500 нг/мл His-меченного HuTIGIT и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Связанный с планшетом His-меченный HuTIGIT затем выявляли с использованием HRP-конъюгированных антител против His-метки и ТМВ-субстрата. Результаты указанного анализа на фиг. 34 демонстрируют, что Vi-LT-1 и Vi-LT-3 могут одновременно связываться с LAG-3 и с TIGIT.

На фиг. 35A-35D показаны фармакокинетические профили и период полувыведения *in vivo* (T1/2), соответствующие исходному mAb против LAG-3 (фиг. 35A), эталонному mAb против LAG-3 (фиг. 35B), Vi-LT-1 (фиг. 35C) или Vi-LT-3 (фиг. 35D) после инъекции в хвостовую вену самкам мышей CD1 в возрасте 6-10 недель. Антитела и биспецифичные антагонисты восстанавливали из сыворотки, полученной в разное время после инъекции, и подвергали анализу с помощью ИФА. Результаты показывают, что Vi-LT-1 и Vi-LT-3 имеют фармакокинетические свойства, сходные с исходным антителом против LAG3 и эталонным антителом, с периодом полувыведения (T1/2), составляющим 5-6 дней.

Для оценки гомогенности по составу и стабильности очищенных с помощью белка А Vi-LT-1 и Vi-LT-3 получали профили эксклюзионной хроматографии (SEC) для Vi-LT-1 и Vi-LT-3, как описано выше. Результаты указанного анализа на фиг. 36A согласуются с данными для обоих удлинённых линкеров scFv, обеспечивающих гомогенность по составу и хорошую стабильность через 7 дней при 4°C. На фиг. 36B показан анализ с помощью ультравысокоэффективной эксклюзионной жидкостной хроматографии (SE-UHPLC), проведенный, как описано выше. Результаты указанного анализа согласуются с гомогенностью по составу, наблюдаемой на фиг. 36A, как видно по низкому уровню высокомолекулярных (high molecular weight, HMW) продуктов на 0 и 7 день (1,3%, 1,5% соответственно для Vi-LT-1 и 1,3%, 1,4%, соответственно для Vi-LT-3) и низкомолекулярных (low molecular weight, LMW) продуктов на 0 и 7 день (0,2%, 0,2% соответственно для Vi-LT-1 и 0,3%, 0,5% соответственно для Vi-LT-3) по сравнению с димерными продуктами на 0 и 7 день (98,4%, 98,3% соответственно для Vi-LT-1 и 98,4%, 98,1% соответственно для Vi-LT-3).

Для оценки способности Vi-LT-1 и Vi-LT-3 вызывать продукцию IFN- γ , МКПК человека стимулировали SEB в концентрации 100 нг/мл в присутствии клеток SHP-77 (фиг. 37A) или клеток H358 (фиг. 37B) с получением иммуносупрессивного сигнала. Затем добавляли контрольные IgG человека (дорожка 3), mAb против TIGIT (B21-35) отдельно (дорожка 4), mAb против LAG-3 отдельно (дорожка 5), комбинацию mAb против TIGIT и mAb против LAG-3 (дорожка 6), Vi-LT-1 (дорожка 7) или Vi-LT-3 (дорожка 8) для восстановления функции Т-клеток (фиг. 37A, 37B). Через 4 дня супернатанты клеточной культуры собирали и проверяли в них уровень IFN- γ с помощью ИФА. Результаты указанных анализов на фиг. 37A и 37B показывают, что LT-1 и LT-3 являются более активными по сравнению с комбинацией исходных антител против TIGIT и LAG-3.

На фиг. 38 показана оценка способности Vi-LT-1 и Vi-LT-3 индуцировать пролиферацию CD4 Т-клеток. Человеческие МКПК метили с помощью CSFE и затем стимулировали SEB в концентрации 100 нг/мл в присутствии клеток SHP-77 с получением иммуносупрессорного сигнала. 128 нМ контрольных человеческих IgG (дорожка 3), mAb против TIGIT B21-35 (дорожка 4), mAb против LAG-3 (дорожка 5), комбинации mAb против TIGIT и mAb против LAG-3 (дорожка 6), Vi-LT-1 (дорожка 7) или Vi-LT-3 (дорожка 8) использовали для восстановления функции Т-клеток. Через 5 дней потерю CFSE-сигнала на CD4 Т-клетках количественно оценивали с помощью FACS для определения индекса пролиферации. Подобно повышению стимуляции IFN γ по сравнению с исходными антителами и комбинацией двух исходных антител, как Vi-LT-1, так и Vi-LT-3 имели повышенную способность стимулировать пролиферацию CD4 Т-клеток человека.

Приведенное выше описание предназначено для разъяснения специалистам в данной области техники, как применять на практике настоящее изобретение, и не предназначено для подробного описания всех тех очевидных модификаций и вариантов, которые будут очевидны специалисту в данной области техники после прочтения описания. Однако предполагается, что все такие очевидные модификации и варианты включены в объем настоящего изобретения, который определяется следующей далее формулой изобретения. Предполагается, что формула изобретения включает заявленные компоненты и этапы в любой последовательности, которая является эффективной для достижения предполагаемых целей, если иное конкретно не следует из контекста.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Противоопухолевый антагонист, содержащий:

первый нацеливающий домен, который специфично связывается с PD-1 или LAG-3; и второй нацеливающий домен, содержащий scFv, который специфично связывается с TIGIT, причем указанный scFv содержит:

(1) HCVR иммуноглобулина, содержащую три определяющих комплементарность участка (HCDR): HCDR1, HCDR2 и HCDR3,

причем HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, причем HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, причем HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25; и

(2) LCVR иммуноглобулина, содержащую три определяющих комплементарность участка (LCDR): LCDR1, LCDR2 и LCDR3,

причем LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, причем LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46, и причем LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 47;

причем указанный первый нацеливающий домен, который специфично связывается с PD-1, содержит:

(a) HCVR иммуноглобулина, содержащую три определяющих комплементарность участка (HCDR): HCDR1, HCDR2 и HCDR3,

причем HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, причем HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, причем HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81; и

(b) LCVR иммуноглобулина, содержащую три определяющих комплементарность участка (LCDR): LCDR1, LCDR2 и LCDR3,

причем LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93, причем LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94, и причем LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95; и

причем указанный первый нацеливающий домен, который специфично связывается с LAG-3, содержит:

(i) HCVR иммуноглобулина, содержащую три определяющих комплементарность участка (HCDR): HCDR1, HCDR2 и HCDR3,

причем HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 163, причем HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 164, причем HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 165; и

(ii) LCVR иммуноглобулина, содержащую три определяющих комплементарность участка (LCDR): LCDR1, LCDR2 и LCDR3,

причем LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 172, причем LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 173, и причем LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 174.

2. Противоопухолевый антагонист по п.1, отличающийся тем, что указанный первый нацеливающий домен специфично связывается с PD-1 и содержит:

(1) HCVR иммуноглобулина, содержащую три определяющих комплементарность участка (HCDR): HCDR1, HCDR2 и HCDR3,

где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, где HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 80, где HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81; и

(2) LCVR иммуноглобулина, содержащую три определяющих комплементарность участка (LCDR): LCDR1, LCDR2 и LCDR3,

где LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93, где LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94, и где LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95.

3. Противоопухолевый антагонист по п.2, отличающийся тем, что указанный первый нацеливающий домен содержит:

HCVR иммуноглобулина, которая имеет, по меньшей мере, 90% идентичности с SEQ ID NO: 106; и/или

LCVR иммуноглобулина, которая имеет, по меньшей мере, 90% идентичности с SEQ ID NO: 107.

4. Противоопухолевый антагонист по п.3, отличающийся тем, что указанный первый нацеливающий домен содержит:

HCVR иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106; и/или

LCVR иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107.

5. Противоопухолевый антагонист по п.1, отличающийся тем, что указанный первый нацеливающий домен специфично связывается с LAG-3 и содержит:

(1) HCVR иммуноглобулина, содержащую три определяющих комплементарность участка (HCDR): HCDR1, HCDR2 и HCDR3,

где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 163, где HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 164, где HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 165; и

(2) LCVR иммуноглобулина, содержащую три определяющих комплементарность участка (LCDR): LCDR1, LCDR2 и LCDR3,

где LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 172, где LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 173, и где LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 174.

6. Противоопухолевый антагонист по п.5, отличающийся тем, что указанный первый нацеливающий домен содержит:

HCVR иммуноглобулина, которая, по меньшей мере, на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 180; и/или

LCVR иммуноглобулина, которая, по меньшей мере, на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 181.

7. Противоопухолевый антагонист по п.6, отличающийся тем, что указанный первый нацеливающий домен содержит:

HCVR иммуноглобулина, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 180; и/или

LCVR иммуноглобулина, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 181.

8. Противоопухолевый антагонист по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что указанный scFv содержит:

HCVR иммуноглобулина, которая имеет, по меньшей мере, 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 66; и/или

LCVR иммуноглобулина, которая имеет, по меньшей мере, 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 67.

9. Противоопухолевый антагонист по п.8, отличающийся тем, что указанный scFv содержит:

HCVR иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66; и/или

LCVR иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67.

10. Противоопухолевый антагонист по любому из пп.1-9, дополнительно содержащий иммуноглобулиновый каркас, имеющий аминоконец и карбокси-конец,

причем указанный первый нацеливающий домен связан с аминоконцом указанного иммуноглобулинового каркаса и указанный второй нацеливающий домен связан с карбокси-концом указанного иммуноглобулинового каркаса с помощью пептидного линкера, и

причем указанный пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 188-191.

11. Противоопухолевый антагонист по любому из пп.2-4, который содержит:

тяжелую цепь иммуноглобулина, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 160 или 162; и/или

легкую цепь иммуноглобулина, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 161.

12. Противоопухолевый антагонист по любому из пп.5-7, который содержит:

тяжелую цепь иммуноглобулина, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 192 или 193; и/или

легкую цепь иммуноглобулина, которая имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 194.

13. Нуклеиновая кислота, кодирующая один или более доменов противоопухолевого антагониста по любому из пп.1-12.

14. Вектор экспрессии, содержащий одну или более нуклеиновых кислот по п.13.

15. Способ лечения клеточного пролиферативного расстройства у субъекта, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества противоопухолевого антагониста по любому из пп.1-12, нуклеиновой кислоты по п.13 или вектора экспрессии по п.14.

16. Способ лечения по п.15, отличающийся тем, что клеточное пролиферативное расстройство представляет собой опухоль или рак.

Последовательности моноклонального антитела против TIGIT

Mab	CDR1 тяжелой цепи		CDR2 тяжелой цепи		CDR3 тяжелой цепи	
T-01	SDYAWN	(SEQ ID:1)	YISVSGTGYNPSLKS	(SEQ ID:2)	RMIGYAMBY	(SEQ ID:3)
T-02	SDYAWN	(1)	YITVSGGTSYNPSLKS	(SEQ ID:4)	RQIGLGFTY	(SEQ ID:5)
T-03	DHTIH	(SEQ ID:6)	YFYPRDGSSTKYNEKFKG	(SEQ ID:7)	GMLRWFAD	(SEQ ID:8)
T-04	DHTIH	(6)	YIYPRDGSSTKYNEKFKG	(SEQ ID:9)	GMLRWFAY	(SEQ ID:10)
T-05	DQAIH	(SEQ ID:11)	YIYPRDGSSTKYNETFKG	(SEQ ID:12)	GMLRWFAY	(10)
T-06	SDYAWN	(1)	YITVSGGTSYNPSLKS	(SEQ ID:13)	RQVGLGFAY	(SEQ ID:14)
T-07	SDSAWN	(SEQ ID:15)	YITVSGSTNYNPSLRS	(SEQ ID:16)	RQVGLGFAY	(14)
T-08	NYGMN	(SEQ ID:17)	WINTYTGEPTYADDFKG	(SEQ ID:18)	APPYGYDVFAY	(SEQ ID:19)
T-09	TFAMGVG	(SEQ ID:20)	HIWDDDKYYNPALKS	(SEQ ID:21)	MDYSYFAWFAY	(SEQ ID:22)
T-10 (B21-35)	SYMH	(SEQ ID:23)	INPSGGRTSYAQMFGQ	(SEQ ID:24)	DREEQWPVGGFDY	(SEQ ID:25)

Mab	CDR1 легкой цепи		CDR2 легкой цепи		CDR3 легкой цепи	
T-01	KASQDVSTVVA	(SEQ ID:26)	SASYRYT	(SEQ ID:27)	QQHYSTPWT	(SEQ ID:28)
T-02	KASQDLSTAVA	(SEQ ID:29)	SSSYRYT	(SEQ ID:30)	QQHYSTPWT	(28)
T-03	KASQDVSTTVA	(SEQ ID:31)	SASYRYT	(27)	QQHYSTPLT	(SEQ ID:32)
T-04	KASQDVFTAVA	(SEQ ID:33)	SASYRYT	(27)	QQHYSIPLT	(SEQ ID:34)
T-05	KASQDVSTAVA	(SEQ ID:35)	SASYRYT	(27)	QQHYSTPLT	(32)
T-06	KASQDVSTAVA	(35)	SASYHYT	(SEQ ID:36)	QQHYSTPWT	(28)
T-07	KASQDVSTAVA	(35)	SASYRFT	(SEQ ID:37)	QHHYSTPWT	(SEQ ID:38)
T-08	RSSQSIHVSNGNTYLE	(SEQ ID:39)	KVSDRFS	(SEQ ID:40)	FOGSHVPWT	(SEQ ID:41)
T-09	RSSGTAVTTSNYAN	(SEQ ID:42)	GTNNRAP	(SEQ ID:43)	ALWYSNHVV	(SEQ ID:44)
T-10	RASQSIRRYLN	(SEQ ID:45)	SASNLS	(SEQ ID:46)	QQSYIPIPT	(SEQ ID:47)

Фиг. 1

Последовательности варибельного домена антитела против TIGIT

T-01

VH (SEQ ID NO: 48)

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITSDYAWNWRIRQPPGKGLEWIGYISYSGSTGY
NPSLKSRTVTSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARRMIGYAMDYWGQGTSTVTVSS

VL (SEQ ID NO: 49)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVSTVVAWHQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPQQHYSTPWTFGGGTKLEIKR

T-02

VH (SEQ ID NO: 50)

QVKLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTGYSITSDYAWNWRIRQPPGKGLEWIGYITVSGGTSY
NPSLKSRTVTSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYSCARRQIGLGFTYWGQGTSLTVSA

VL (SEQ ID NO: 51)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITPCKASQDLSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSSSYRYTGVP
RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPQQHYSTPWTFGEGTKLEIK

T-03

VH (SEQ ID NO: 52)

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFDHTIHVWVQAPGKGLEWIMGYFYPRDGS
KYNEKFKGRVITADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATGMLRWFADWGQGTITVSA
VA

VH (SEQ ID NO: 53)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVSTTVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYSTPLTFGAGTKLELK

Фиг. 2А

T-04

VH (SEQ ID NO: 54):

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFDHTIHWVQQAPGKGLEWMGYIYPRDGSS
KYNVKFKGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCATGMLRWFAYWGQGLVTV
SS

VL (SEQ ID NO: 55):

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVFTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVP
SRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQHYSIPLTFGAGTKLEIK

T-05

VH (SEQ ID NO: 56):

EVQLKQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFDQAIHWVQQAPGKGLEWMGYIYPRDGST
KYNVTFKGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDVAVYFCARGMLRWFAYWGQGLVTVS
S

VL (SEQ ID NO: 57):

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYSTPLTFGAGTKLELK

T-06

VH (SEQ ID NO: 58):

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSVSSDYAWNWIWIRPPGKGLEWIGYITYSGSTS
YNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARRQVGLGFAYWGQGLVTVS
A

VL (SEQ ID NO: 59):

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYHYTGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYSTPWTFGGGKLEIK

T-07

VH (SEQ ID NO: 60):

EVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCVSGYSITSDSAWNWIWIRPPGKGLEWIGYITYSGSTNY
NPSLRSRVTMSVDTSKNQFSLKLSVTAVDVAVYYCTRQVGLGFAYWGQGLVTVSA

VL (SEQ ID NO: 61):

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRFTGAP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFGIYYCQHHSYTPWTFGGGKLEFK

Фиг. 2B

T-08

VH (SEQ ID NO: 62):

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYFTFTNYGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTYTG
EPTYADDFKGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARAPPYGYDVRFAFWGQG
TLVTVSS

VL (SEQ ID NO: 63):

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWFQQRPGQSPRVLIYKVSDFR
SGVPDFRSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPWTFGRGTKLEIK

T-09

VH (SEQ ID NO: 64):

QVTLKESGPTLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTFAMGVGWIRQPPGKALEWLAHIWDDDD
KYYPALKSRLTITKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARMDYSYFAWFAFWGQG
TLVTVSS

VL (SEQ ID NO: 65):

QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQLFRGLIGGTNNRAP
WVPARFSGSLIGDKAALTLSGVQPEDEAEYFCALWYSNHWFVGGGKTLTVL

T-10 (B21-35)

VH (SEQ ID NO: 66):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFTSYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGR
TSYAQMFGQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARDREEQWPVGGFDYWGQ
GTLVTVSS

VL (SEQ ID NO: 67):

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSIRRYLNWYQKPGKAPKLLIYSASNLQSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQSYIHPPTFGQGTKVEIK

Фиг. 2С

Последовательности моноклонального антитела против PD1

Mab	CDR1 тяжелой цепи		CDR2 тяжелой цепи		CDR3 тяжелой цепи	
D-01	NFLMS	(SEQ ID:68)	TISGGGRDITYVDSVKG	(SEQ ID:69)	RTTYSMDY	(SEQ ID:70)
D-02	NSVLY	(SEQ ID:71)	GINPSNGGTFNNEKFKT	(SEQ ID:72)	RDYNYDGGFDS	(SEQ ID:73)
D-03	NSYIY	(SEQ ID:74)	GINPSNGGTFNNEKFKT	(72)	RRDYRYDGGFDS	(SEQ ID:75)
D-04	NSYIY	(74)	GINPSNGGTFNNEKFKT	(72)	RDYNYDGGFDS	(53)
D-05 (2P16)	TYIYI	(SEQ ID:76)	GINPSNGGTFNNEKFKI	(SEQ ID:77)	RYHGYDGGLDY	(SEQ ID:78)
D-06 (2P17)	SYIHI	(SEQ ID:79)	WIFPGSGNSKYNEFKG	(SEQ ID:80)	SETYDYGBY	(SEQ ID:81)
Mab	CDR1 легкой цепи		CDR2 легкой цепи		CDR3 легкой цепи	
D-01	LASQTIGTWLA	(SEQ ID:82)	AATSLAD	(SEQ ID:83)	QQFYSIPWT	(SEQ ID:84)
D-02	RASSTLYSNYLH	(SEQ ID:85)	RASFLAS	(SEQ ID:86)	QQGSSIPT	(SEQ ID:87)
D-03	SASSLYSSYLH	(SEQ ID:88)	RASFLAS	(86)	QQGSSIPT	(87)
D-04	RASSLYSNYLH	(SEQ ID:89)	RASFLAS	(86)	QQGSSIPT	(87)
D-05	RASKSVSTSGFSYIH	(SEQ ID:90)	LASNLES	(SEQ ID:91)	QHTWELPNT	(SEQ ID:92)
D-06	KASQNVGTNVA	(SEQ ID:93)	SASYRYS	(SEQ ID:94)	QQYYSYPYT	(SEQ ID:95)

Фиг. 3

Последовательности переменного домена антитела против PD-1

PD-01

VH (SEQ ID NO: 96):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFLMSWVRQAPGGKLEWVSTISGGGR
 DTYYVDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRTYSMDYWGQGT
 SVTVSS

VL (SEQ ID NO: 97):

DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCLASQTIGTWLAWYQQKPGKAPKLLIYAATSLADG
 VPSRFRSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFYSPWTFGGGKLEIK

PD-02

VH (SEQ ID NO: 98):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASDYFTFTNSYLYWLRQAPGGLEWMGGINPSN
 GGTNFKKTRVTSRDTSTAYMELSRRLSDDTVVYYCTRRDYNVDGGFDSWG
 QGTLVTVSS

VL (SEQ ID NO: 99):

DIQMTQSPSSLASVGDRTFTCRASSTLYSNLHWYQQKPGKAPKLLIYRASFLAS
 GVPSRFRSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGSSIPLTFGGGKLEIK

PD-03

VH (SEQ ID NO: 100)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASDYFTFTNSYIYWVRQAPGGLEWMGGINPSN
 GGTNFKKTRVTSRDTSTAYMELSRRLSDDTVVYYCARRDYRYDGGFDSWG
 QGTLVTVSS

VL (SEQ ID NO: 101)

DIQMTQSPSSLASVGDRTITCSASSLYSNLHWYQQKPGKAPKLLIYRASFLASG
 VPSRFRSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGSSIPLTFGAGTKLDLK

Фиг. 4А

PD-04

VH (SEQ ID NO: 102):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASDYFTFTNSYIYWVRQAPGGLEWMGGINPSN
 GGTNFKKTRVTSRDTSTAYMELSRRLSDDTVVYYCARRDYNVDGGFDSWG
 QGTLVTVSS

VL (SEQ ID NO: 103):

DIQMTQSPSSLASVGDRTFTCRASSLYSNLHWYQQKPGKAPKLLIYRASFLAS
 GVPSRFRSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGSSIPLTFGGGKLEIK

PD-05

VH (SEQ ID NO: 104):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFTYYIYWVRQAPGGLEWMGGINPGN
 GGTNFKKTRVVTMTRDTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARRYHGYDGGLDYWG
 QGTLVTVSS

VL (SEQ ID NO: 105):

DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASKSVSTSGFSYIHWYQQKPGQPKLLIYLASNLE
 SGVPSRFRSGSGTDFTLTINPVEANDTANYCQHTWELPNTFGGGKLEIK

PD-06

VH (SEQ ID NO: 106):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFTSYIHWVRQAPGGLEWMGWIFPGS
 GNSKYNENFKGRVTLTADTSTVYMESSLRSEDVAVYYCASETYDYGDYWGQGT
 LTVSS

VL (SEQ ID NO: 107):

DIQMTQSPSFLASVGDRTITCKASQNVGTNVAWYQQKPGKAPKALIYSASYRSG
 VPSRFRSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYSYPYTFGGGKLEIK

Фиг. 4В

Последовательности моноклонального антитела против PD-L1

Mab	CDR1 тяжелой цепи		CDR2 тяжелой цепи		CDR3 тяжелой цепи	
PL-01	NYWMH	(SEQ ID:108)	MIHPNTNNYNYNEKFKS	(SEQ ID:109)	SDYGSSPYFDY	(SEQ ID:110)
PL-02	SYWMH	(SEQ ID:111)	MIHPNVGSTNYNEKFKS	(SEQ ID:112)	SRYGSSPYFDY	(SEQ ID:113)
PL-03	SYWMH	(111)	MIHPNSGGNNYNEKFKS	(SEQ ID:114)	SWYGSSPYFDY	(SEQ ID:115)
PL-04	SYWMH	(111)	MIHPITGVSTDYNEKFKS	(SEQ ID:116)	SDYGSSPYFDY	(110)
PL-05	SDYAWN	(SEQ ID:117)	YISDSGTSYNSPLKS	(SEQ ID:118)	SFLRLRSYFDH	(SEQ ID:119)
PL-06	SYGIN	(SEQ ID:120)	CIVIGNDYTYNEKFKG	(SEQ ID:121)	AYYGSRVYD	(SEQ ID:122)
PL-07	SYGIN	(120)	CIVIGNDYTYNEKFKG	(121)	AYYGSRVYD	(122)
PL-08	SYWMH	(111)	MIHPNSGGNNYNEKFKS	(114)	SWYGSSPYFDY	(115)
Mab	CDR1 легкой цепи		CDR2 легкой цепи		CDR3 легкой цепи	
PL-01	RASQDIDNYLN	(SEQ ID:123)	YTSRLHS	(SEQ ID:124)	QQGYTLPWT	(SEQ ID:125)
PL-02	RASQDISNYLN	(SEQ ID:126)	YTSRLQS	(SEQ ID:127)	QQGNTLPWT	(SEQ ID:128)
PL-03	RASQDISNYLN	(126)	YTSRLHS	(124)	QQGNTLPWT	(128)
PL-04	RASQDISNYLN	(126)	YTSRLHS	(124)	QQGDTLPWT	(SEQ ID:129)
PL-05	KASQDVNVAVA	(SEQ ID:130)	WASTRHI	(SEQ ID:131)	QQHYSTPYT	(SEQ ID:132)
PL-06	KASQDINKYIA	(SEQ ID:133)	YTSTLQP	(SEQ ID:134)	LQYBNLYT	(SEQ ID:135)
PL-07	QSIDYDLH	(SEQ ID:136)	CASQSIG	(SEQ ID:137)	QNGHSFPYT	(SEQ ID:138)
PL-08	RASQDIDNYLN	(123)	YTSRLHS	(124)	QQGYTLPWT	(125)

Фиг. 5

Последовательности вариабельного домена антитела против PD-L1

PL-01

VH (SEQ ID NO: 139):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSVCKASGYTFTNYWMHWKQAPGQGLEWMGMIHP
 NTNNYNEKFKSRVTSTRDTSISTAYMELSRRLSDDTVVYYCARSDYGSSPYFDY
 WGQGLTIVTSS

VL (SEQ ID NO: 140):

DIQMTQSPSSLSASVGDRTISCRASQDIDNYLNWYQQKPGKAPKLLIKYTSRLHSG
 VPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQGYTLPWTFGGGKVEIK

PL-02

VH (SEQ ID NO: 141):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSVCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGMIHPN
 VGSTNYNEKFKSKATMTRDKSSSTVYMELSSLRSEDTA VYYCARSRYGSSPYFDY
 WGQGLTIVTSS

VL (SEQ ID NO: 142):

DIQMTQSPSSLSASVGDRTISCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLQSGV
 PSRFGSGSGTDFTFITISLQPEDATYFCQQGNTLPWTFGQGTKVEIK

PL-03

VH (SEQ ID NO: 143):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSVCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGMIHPN
 SGGNNYNEKFKSRVTMTRDTSISTAYMELSRRLSDDTA VYYCARSWYGSSPYFDY
 WGQGLTIVTSS

VL (SEQ ID NO: 144):

DIQMTQSPSSLSASVGDRTISCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGV
 PSRFGSGSGTDFTFITISLQPEDATYFCQQGNTLPWTFGQGTKVEIK

Фиг. 6А

PL-04

VH (SEQ ID NO: 145):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGMIHPT
 GVSTDYNEKFKSRVTMTRDTSSTVYMESSLRSEDTAVYYCARSDYGSSPYFDY
 WGQGTLLTVSS

VL (SEQ ID NO: 146):

DIQMTQSPSSLSASVGDRTISCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIKYTSRLHSGV
 PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQGDTLPWTFGGGKVEIK

PL-05

VH (SEQ ID NO: 147):

DVQLQESGPGLVKPSQSLTCTVTGYSITSDYAWNWRQFPGNKLEWMGYISDSGS
 TSYNPSLKSRSITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDATYYCANSFLRLRSYFDHWGQGT
 LTVSS

VL (SEQ ID NO: 148):

DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVNVAVAWYQQKPGQSPKLLIFWASTRHI
 GVPDRFTGSGSGTDYTLTISSVQAEDLALYYCQQHYSTPYTFGGGKLEIK

PL-06

VH (SEQ ID NO: 149):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGINWVRQAPGQRLEWMGWCIYIG
 NDYTNYNEKFKGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAYYGSRVDYWG
 QGTLVTVSS

VL (SEQ ID NO: 150):

DIQMTQSPSSLSAFVGDRTITCKASQDINKYIAWYQQKPGKAPKLLIHYTSTLQPGV
 PSRFSGSGSGRDFFTISSLQPEDIATYYCLQYDNLYTFGGGKVEIK

PL-07

VH (SEQ ID NO: 151):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGINWVRQAPGQRLEWMGWCIYIG
 NDYTNYNEKFKGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARAYYGSRVDYWG
 QGTLVTVSS

VL (SEQ ID NO: 152):

EIVLTQSPVTLISLSPGERATLSCQSISDYLHWYLQKPGQAPRLLIKCASQSISGIPAREF
 GSGSGSDFTLTISSLEPEDFAVYYCQNGHSFPYTFGGGKVEIK

фиг. 6B

PL-08

VH (SEQ ID NO: 153):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGMIHPT
 SGGNNYNEKFKSRVTMTRDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCARSWYGSSPYFDY
 WGQGTLLTVSS

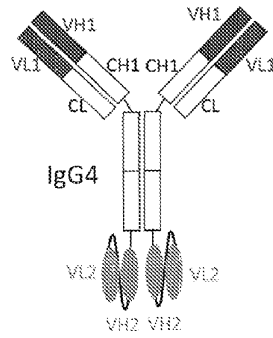
VL (SEQ ID NO: 154):

DIQMTQSPSSLSASVGDRTISCRASQDIDNYLNWYQQKPGKAPKLLIKYTSRLHSG
 VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQQGYTLPWTFGGGKVEIK

фиг. 6C

Антитела против PD-1 с scFv против TIGIT

Антитело против PD-1 (PD-01)



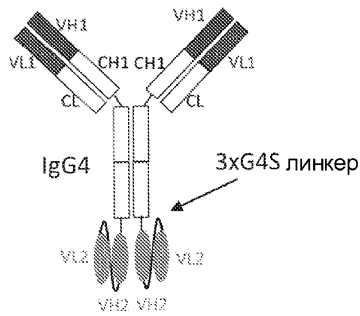
Антитело против TIGIT

Bi-TRM-93

Антитело против PD-1 (PD-06)

Антитело против PD-1 (PD-06)

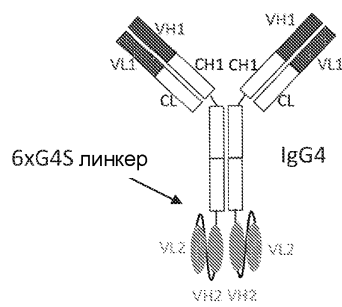
Фиг. 7А



Антитело против TIGIT

Bi-TRM-94A

Фиг. 7B



Антитело против TIGIT

Bi-TRM-94B

Фиг. 7C

Последовательности функциональных доменов на Фиг. 7А-7С

VH/VL-участки домена белка слияния	Аминокислотные последовательности функциональных доменов
HCVR антитела против PD-1 (PD-01)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFLMSWVRQAPGKGLEWVSTISGGGRDITYYVDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRITTYSMQDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO:96)
LCVR антитела против PD-1 (PD-01)	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCLASQTIGTWLAWYQQKPKAPKLLIYAATSLADGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFYSPWTFGGGTKEIK (SEQ ID NO:97)
HCVR антитела против PD-1 (PD-06, 2P17)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYFTFSYIHWVRQAPGQGLEWMGWIFPGSGNSKYNEFKGRVTLTADTSTSTVYMEISSLRSEDVAVYYCASYDYGDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:106)
LCVR антитела против PD-1 (PD-06, 2P17)	DIQMTQSPSFLSASVGDRTITCKASQNVGTNVAWYQQKPKAPKALISASRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSPYTFGGGTKEIK (SEQ ID NO:107)
HCVR антитела против TIGIT (B21-35)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYFTFSYMHVVRQAPGQGLEWMGIINPSGGRTSYAQMFKGRVTMTRDTSTSTVYMEISSLRSEDVAVYYCARDREEQWVPGGFDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:66)
LCVR антитела против TIGIT (B21-35)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSIIRRYLNWYQQKPKAPKLLIYASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYIIPPTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:67)
IgG4 CH1-CH2-CH3 (hinged stabilized S231P)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO: 155)
3xG4S линкер	GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:188)
6xG4S линкер	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:191)

Фиг. 8

Последовательности HC и LC антагонистов на Фиг. 7А-7С

Антагонист (HC/LC)	Аминокислотная последовательность
Bi-TPM-93 HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNFLMSWVRQAPGKGLEWVSTISGGG RDITYYVDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKRTTYSMIDYWGQGT SVTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKISKAKGQPR EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLKGGGGSGGGGS QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPS GGRTSYAQMFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARDREEQWPVGGF DYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQ SIRRYLNWYQKPKGKAPKLLIYASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATY YCQQSYIIPPTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 158) (PD-01)
TPM-93 LC	DIQMTQSPSSVSASVGDRTVITCLASQTIGTWLAWYQQKPGKAPKLLIDAATSLADG VPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYQCQYFYSIPWTFGGGKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 159) (PD-01)
Bi-TPM-94A HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYIHWVRQAPGQGLEWMGWIFPG SGNSKYNENFKGRVTLTADTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCASETYDYGDIWGQGT LVTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPA PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKISKAKGQPRE PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLKGGGGSGGGGS QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPS GGRTSYAQMFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARDREEQWPVGGF DYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQ SIRRYLNWYQKPKGKAPKLLIYASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATY YCQQSYIIPPTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 160)
Bi-TPM-94A LC	DIQMTQSPSFLSASVGDRTVITCKASQNVGTINVAWYQQKPGKAPKALISASRYSG VPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYQCQYYSYPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 161)

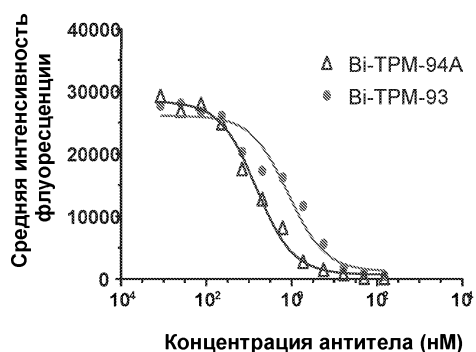
Фиг. 9А

Последовательности HC и LC антагонистов на Фиг. 7А-7С

Антагонист (HC/LC)	Аминокислотная последовательность
Bi-TPM-94B HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYIHVWRQAPGGGLEWMGWIFPGSG NSKYNENFKGRVTLTADTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCASETYDYGDYWGQGLTVTV SSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVGHVTFPAVLQS SGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEFLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPVETCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLKGGGGGGGGGGGGVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSKASGYTFTSYMHVWRQAPGGGLEWMGIINPSGGRTSYAQMFQGRVTMTR DTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARDREEQWVPGGFDYWGQGLTVVSSGGGGGGGG GG GG WYQQKPKGKAPKLLIYSASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYHPP TFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 162)
Bi-TPM-94B LC	DIQMTQSPSFLASVGDRTVITCKASQNVGTNVAWYQQKPKGKAPKALIIYSASYRYSGVP SRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 161)

Фиг. 9В

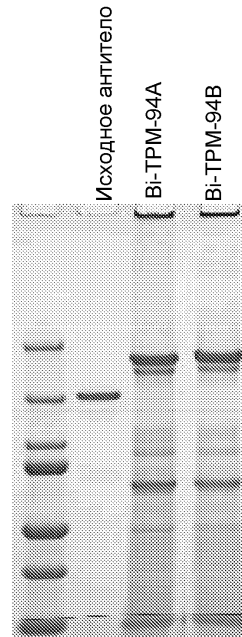
Bi-TPM-94A является более активным
блокатором PD-1 по сравнению с Bi-TPM-93



Молекула	IC50 (нМ)
Bi-TPM-93	0,83
Bi-TPM-94A	0,15

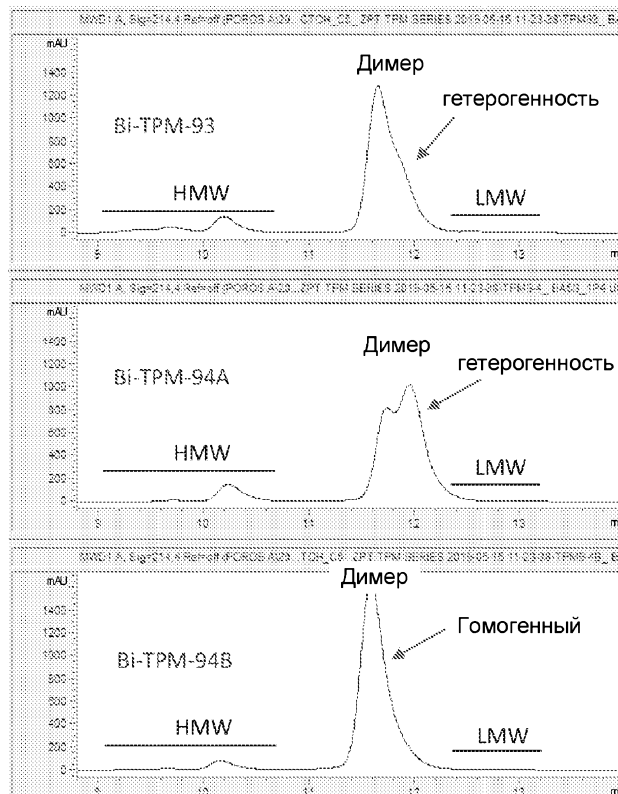
Фиг. 10

Высокий уровень временной экспрессии Vi-TRM-94B



Фиг. 11

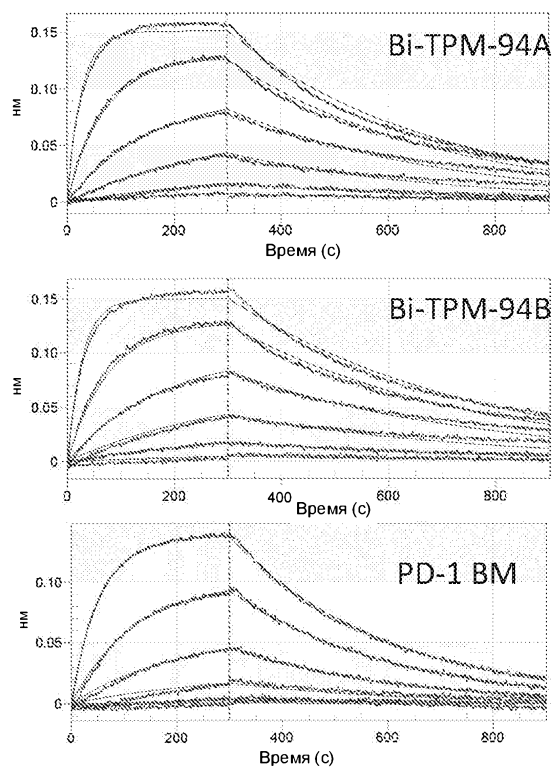
Ультравысокоэффективная эксклюзионная жидкостная хроматография выявила гетерогенность по составу образцов Vi-TRM-93 и Vi-TRM-94A, которая устранялась путем модификации линкера в Vi-TRM-94B



Фиг. 12

Vi-TPM-94A и -94B связываются с PD-1 лучше по сравнению с эталонным антителом

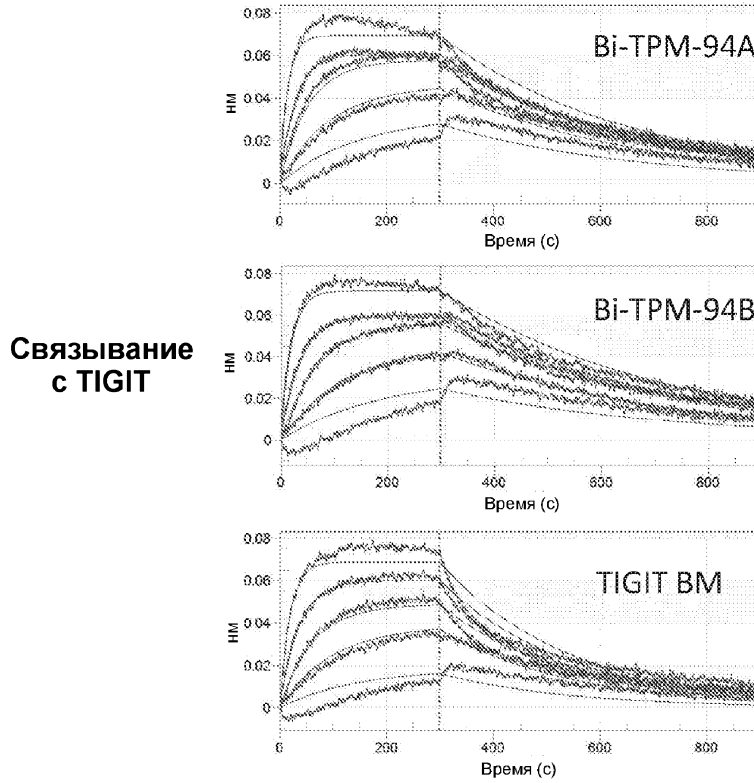
Связывание с PD-1



Антитело	Растворимый PD-1 человека		
	K_D (нМ)	K_a ($M^{-1}s^{-1}$)	K_d (s^{-1})
Vi-TPM-94A	2,9	4,37E+05	1,27E-03
Vi-TPM-94B	2,7	4,11E+05	1,10E-03
Эталонное антитело против PD-1	8,8	1,88E+05	1,66E-03

Фиг. 13А

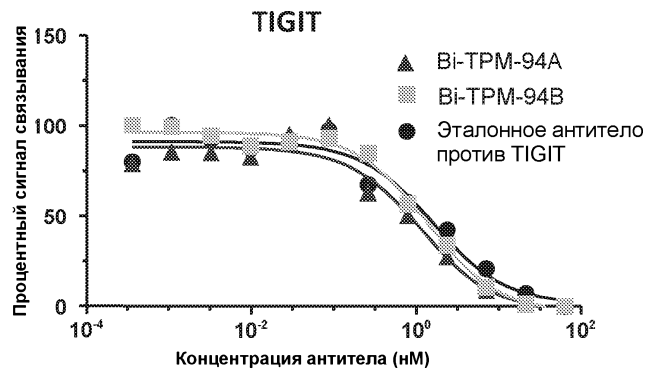
Vi-TPM-94A и -94B связываются с TIGIT лучше по сравнению с эталонным антителом



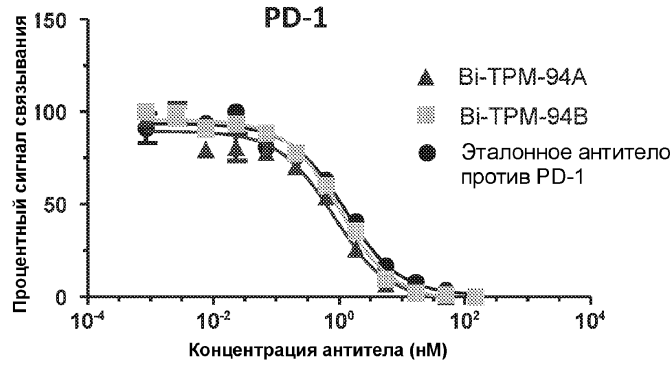
Антагонист	Растворимый TIGIT человека		
	K_D (нМ)	K_a ($M^{-1}s^{-1}$)	K_d (s^{-1})
Vi-TPM-94A	1,5	1,80E+06	2,71E-03
Vi-TPM-94B	1,7	1,35E+06	2,33E-03
Эталонное антитело против TIGIT	3,1	1,34E+06	4,11E-03

Фиг. 13В

Vi-TPM-94A и Vi-TPM-94B активно блокируют связывание PD-1 и TIGIT с их лигандами

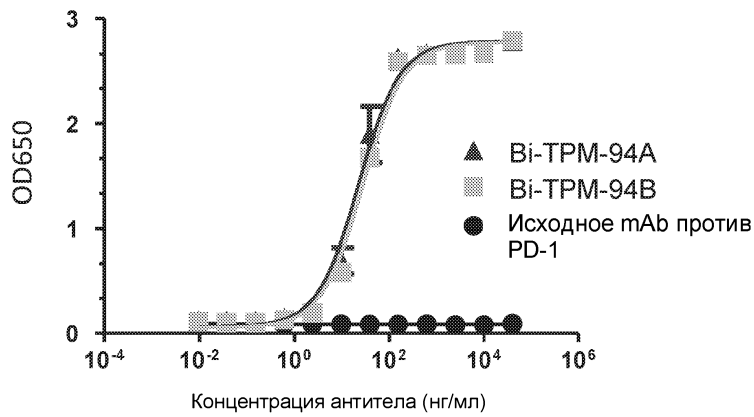


Фиг. 14А



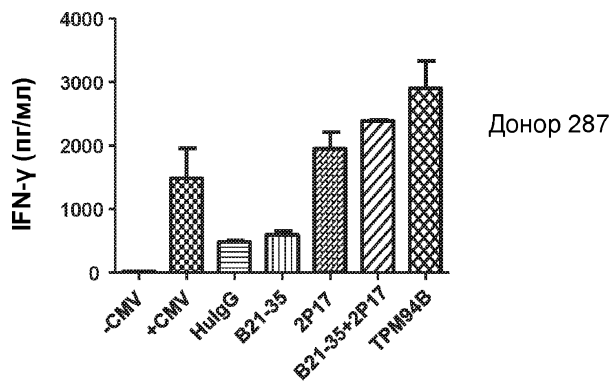
Фиг. 14В

Bi-TPM-94A и Bi-TPM-94B могут одновременно связываться с PD-1 и TIGIT



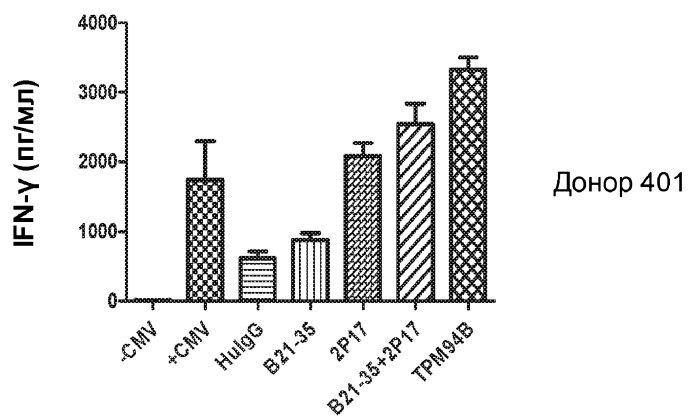
Фиг. 15

Bi-TPM-94B вызывает более высокую продукцию IFN-γ по сравнению с комбинацией отдельных антител во время ответа на ЦМВ-стимуляцию МКПК человека



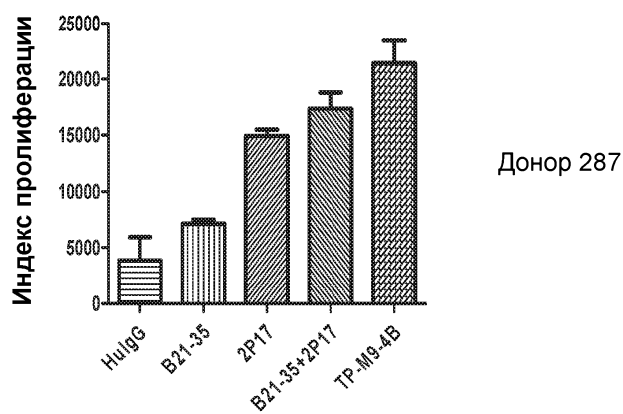
Фиг. 16А

045974

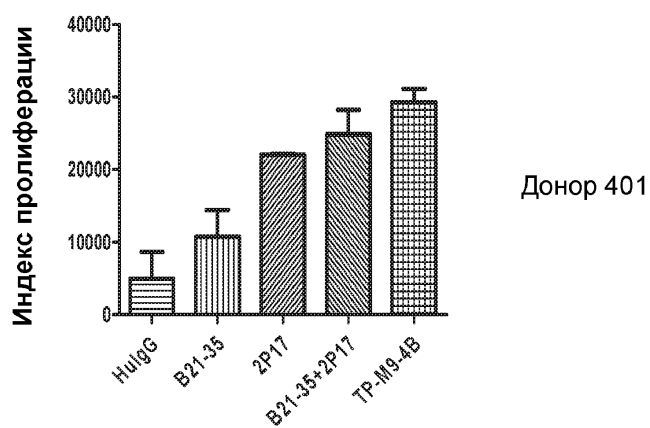


Фиг. 16В

Vi-TRM-94B вызывает более активную пролиферацию Т-клеток по сравнению с комбинацией антител во время ответа на ЦМВ-стимуляцию МКПК человека

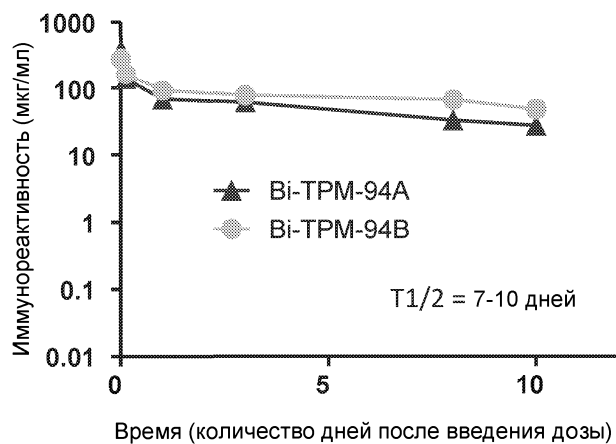


Фиг. 17А



Фиг. 17В

Фармакокинетические свойства Vi-TPM-94A и Vi-TPM-94B у мышей



Фиг. 18

Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 mAb против LAG-3

mAb	HCDR1	HCDR2	HCDR3
2L2A.1	DYYMN (SEQ ID:163)	VINPYNGDTSYNQKFKG (SEQ ID:164)	DDGYVHYFDY (SEQ ID:165)
2L2A.6	DYYMN (SEQ ID:163)	VINPYNGDTSYNQKFKG (SEQ ID:164)	DDGYVHYFDY (SEQ ID:165)
2L27B	HYYMN (SEQ ID:166)	LINPYNGDTAYNQKFKD (SEQ ID:167)	TRDDGYVVEH (SEQ ID:168)
3L1A	TAYTIH (SEQ ID:169)	WLYPGNDNIMYNENFKD (SEQ ID:170)	HEDWGPLDY (SEQ ID:171)

Фиг. 19A

mAb	LCDR1	LCDR2	LCDR3
2L2A.1	RASQDISSRLT (SEQ ID:172)	ATSSLDS (SEQ ID:173)	LQYASSPLT (SEQ ID:174)
2L2A.6	RASQDISSRLT (SEQ ID:172)	ATSSLDS (SEQ ID:173)	LQYASSPLT (SEQ ID:174)
2L27B	RASQDIGSRLN (SEQ ID:175)	ATSSLDS (SEQ ID:173)	LQYASSPPT (SEQ ID:176)
3L1A	RASQSISS (SEQ ID:177)	RASNLES (SEQ ID:178)	QQSNGLPYT (SEQ ID:179)

Фиг. 19B

Последовательности переменных цепей mAb против LAG-3

2L2A.1

VH (SEQ ID NO: 180)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTLTDYYMNWVRQAPGQGLEWMGVINPYNGDTSYNQKFKGRVTMTR
DTSTSTVYMELSLRSEDVAVYYCVRDDGYVHYFDYWGGQGLTVTVSS

VL (SEQ ID NO: 181)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISSRLTWLQQEPEKAPKRLIYATSSLD SGVPKRFSGSGSGTDFTLTISLQ
EDFATYYCLQYASSPLTFGGGKVEIK

2L2A.6

VH (SEQ ID NO: 182)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTDYMNWVRQAPGQGLEWMGVINPYNGDTSYNQKFKGRVTMTR
DTSTSTVYMELSLRSEDVAVYYCARDGYYVHYFDYWGGQGLTVTVSS

VL (SEQ ID NO: 183)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISSRLTWLQQKPKAPKRLIYATSSLD SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ
EDFATYYCLQYASSPLTFGGGKVEIK

2L27B

VH (SEQ ID NO: 184)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFTFSHYMNWVRQAPGQGLEWMGLINPYNGDTAYNQKFKDRVTMTR
DTSTSTVYMELSLRSEDVAVYFCTRDDGYYVEHFYWDGYYVEHFYWGQGLTVTVSS

VL (SEQ ID NO: 185)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIGSRLNWWYQQKPKAPKRLIYATSSLD SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ
PEDFATYYCLQYASSPPTFGGGKVEIK

3L1A

VH (SEQ ID NO: 186)

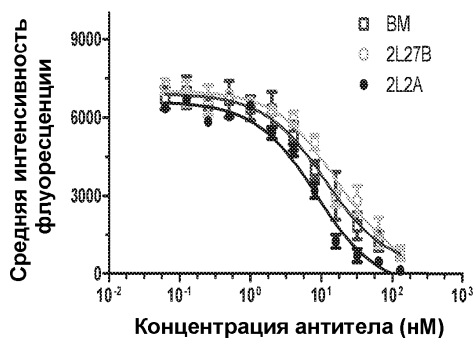
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTAYTIHWVRQAPGQGLEWMGWLYPGNDNIMYNENFKDRVTMTR
DTSTSTVYMELSLRSEDVAVYYCARHEDWGPLDYWGQGLTVTVSS

VL (SEQ ID NO: 187)

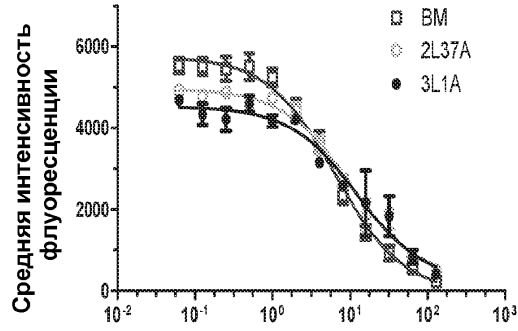
DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSISSWLAWYQQKPKAPKLLIYRASNLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQ
DDFATYYCQSQNGLPYTFGGGKLEIK

Фиг. 20

Мышиные mAb против LAG-3 блокируют взаимодействие между LAG-3 и его лигандом MHC II

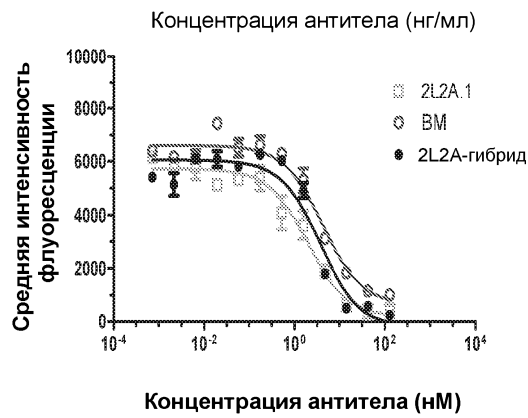


Фиг. 21А



Фиг. 21В

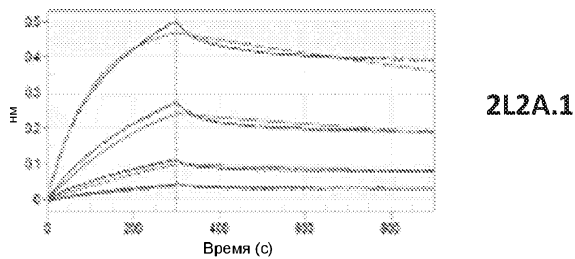
Гуманизированное mAb против LAG-3 2L2A.1 является лучшим блоком по сравнению с эталонным (BM) антителом



Антитело	IC50 (нМ)
2L2A.1	1,97
Эталонное антитело	4,14
2L2A-гибрид	3,74

Фиг. 22

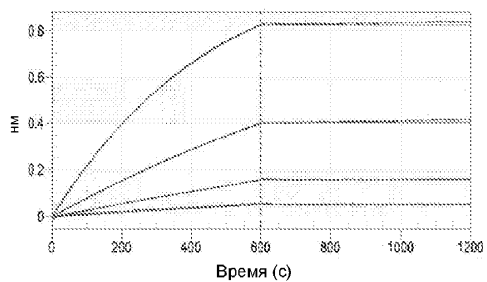
Анализ аффинности 2L2A.1 с помощью поверхностного плазмонного резонанса (ППР)



Антитело	huLAG-3-His		
	K _D (нМ)	K _a (M ⁻¹ с ⁻¹)	K _d (с ⁻¹)
2L2A.1	1420 (±13)	3.93E+05	5.56E-04

Фиг. 23А

045974

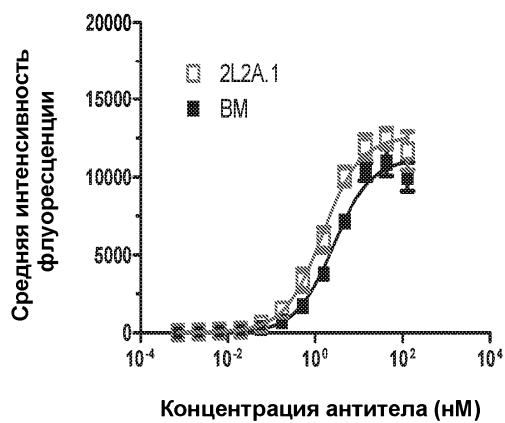


2L2A.1

huLAG-3-mIgG2a			
Антитело	K _D (пМ)	K _a (M ⁻¹ с ⁻¹)	K _d (с ⁻¹)
2L2A.1	1 (+11)	8.49E+04	<1.0E-07

Фиг. 23В

Связывание 2L2A.1 с LAG-3

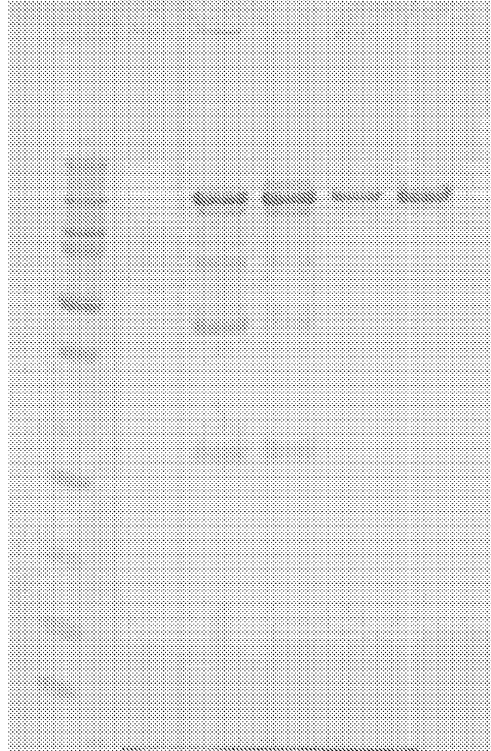


Антитело	IC50 (нМ)
Эталонное антитело	2,64
2L2A.1	1,48

Фиг. 24

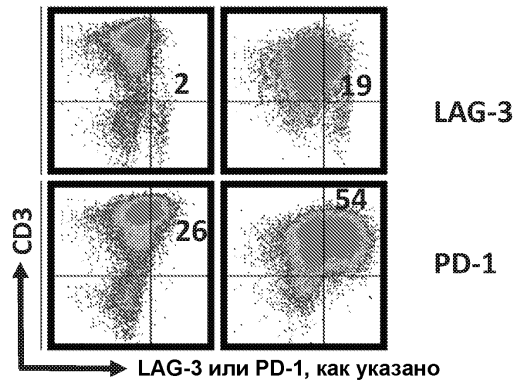
Экспрессия 2L2A.1

3 день (65 ч) стандарт mAb
+ctrl 2L2A.1 1 мкг 2 мкг



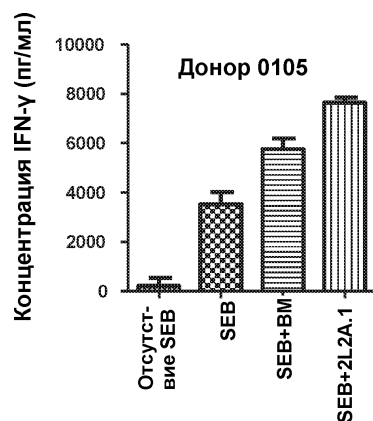
Фиг. 25

МКПК донора
— +
Антитело против hCD3/CD28

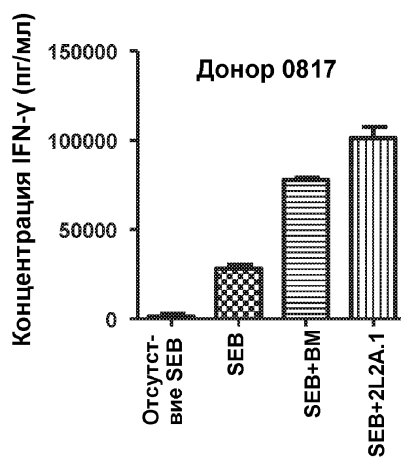


Фиг. 26

тАб против LAG-3 2L2A.1 вызывает более высокую продукцию IFN- γ по сравнению с эталонным (ВМ) антителом против LAG-3

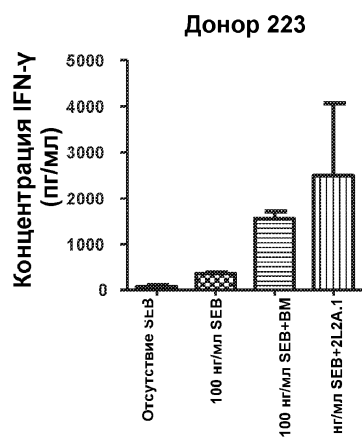


Фиг. 27А

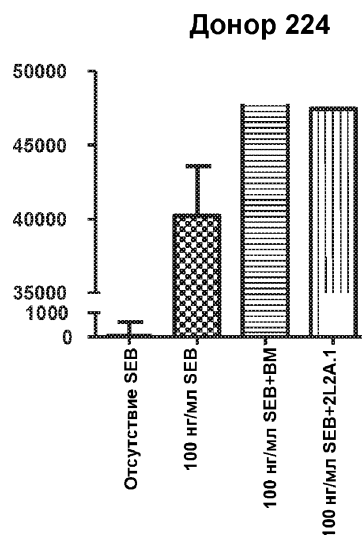


Фиг. 27В

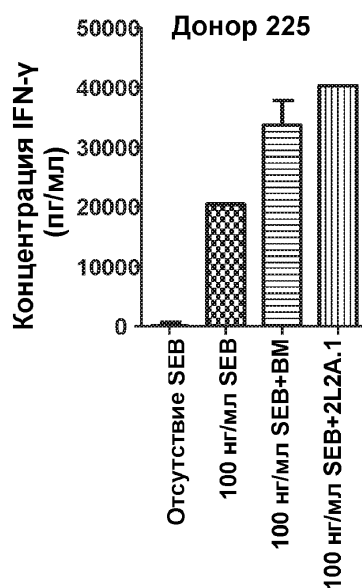
тАб против LAG-3 2L2A.1 может вызывать более высокую продукцию IFN- γ по сравнению с эталонным (ВМ) антителом против LAG-3



Фиг. 28А

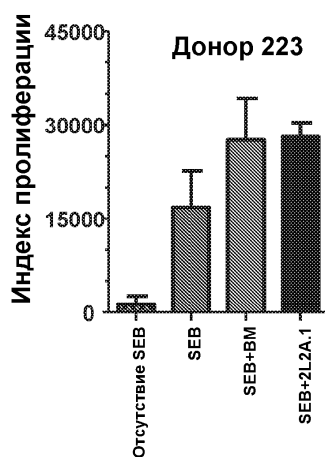


Фиг. 28В

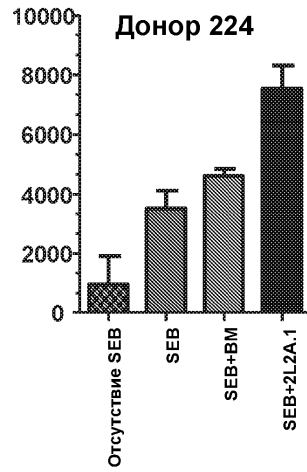


Фиг. 28С

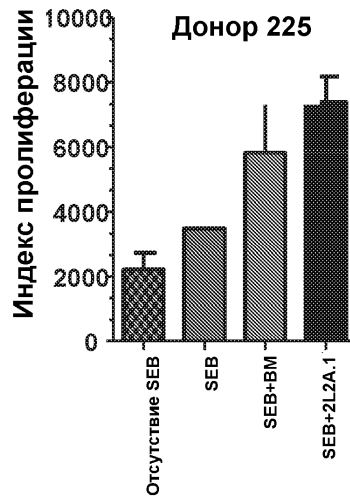
mAb против LAG-3 2L2A.1 может вызывать более активную пролиферацию первичных Т-клеток по сравнению с эталонным (BM) антителом против LAG-3



Фиг. 29А

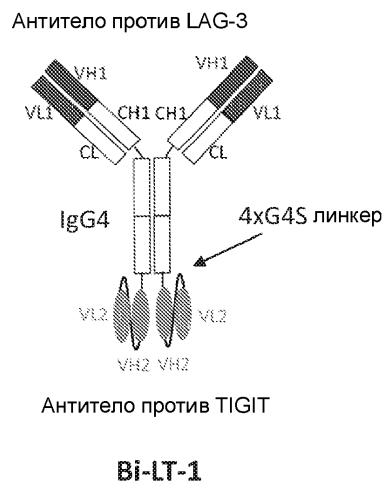


Фиг. 29B



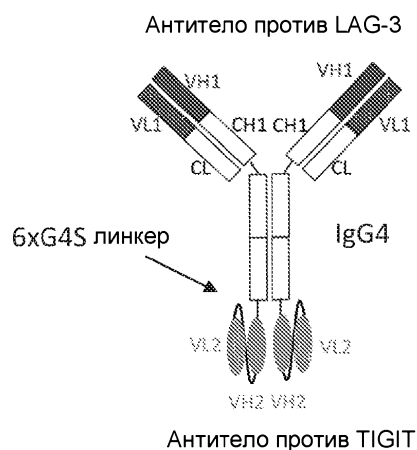
Фиг. 29C

Антитела против LAG-3 с scFv-фрагментами TIGIT



Фиг. 30A

045974



Bi-LT-3

Фиг. 30В

Последовательности функциональных доменов на Фиг. 30А-30В

VH/VL-участки домена белка слияния	Аминокислотные последовательности функциональных доменов
HCVR антитела против LAG-3 (2L2A.1)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTLTDYYMNWMRQAPGQGLEWMGVINPYNGDTSYNQKFKGRVTMTRDSTSTVYMEISSLRSEDAVYYCVRDDGYVHYFDYWGQGLTLTVSS (SEQ ID NO: 180)
LCVR антитела против LAG-3 (2L2A.1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDISSRLTWLQQEPEKAPKRLIYATSSLD SGVPRKRFSGSGGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQYASSPLTFGGGTKEIK (SEQ ID NO: 181)
HCVR антитела против TIGIT (B21-35)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHVWRQAPGQGLEWMGIINPSGGRTSYAQMFQGRVTMTRDSTSTVYMEISSLRSEDAVYYCARDREEQWPVGGFDYWGQGLTLTVSS (SEQ ID NO: 66)
LCVR антитела против TIGIT (B21-35)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQIRRYLNWYQQKPGKAPKLLIYSASNLQSGVPSRFSGSGGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSYIHPPTFGQGTKEIK (SEQ ID NO: 67)
IgG4 CH1-CH2-CH3 (шарнир, стабилизированный S231P)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDNLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 155)
4xG4S линкер	GGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 189)
6xG4S линкер	GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 191)

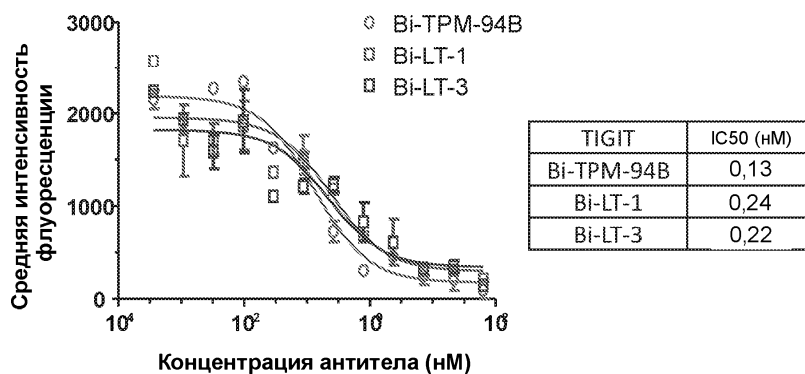
Фиг. 31

Последовательности HC и LC антагонистов Bi-LT-1 и Bi-LT-3 на
Фиг. 30А-30В

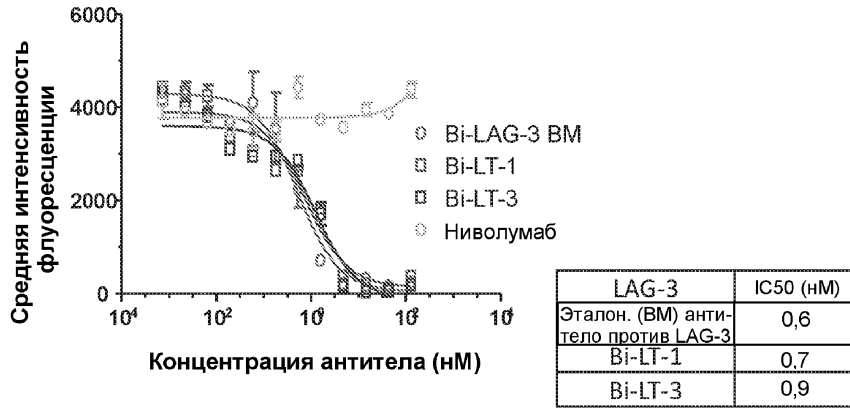
Антагонист (HC/LC)	Аминокислотная последовательность
Bi-LT-1 HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSKASGYTLTDYYMNMWRQAPGGLEWMGVINPYNGDT SYNQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDAVYYCVRDDGYVYHYFDYWGQGLTIVTSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKLSLSLKGKGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSKASGYTFTSYMHWVR QAPGGLEWMGIINPSGGRTSYAQMFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDAVYYCARD REEQWPVGGFDYWGQGLTIVTSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASV DRVITICRASQSIRRYLNWYQKPKGKAPKLLIYSASNLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISSLQPE DFATYYCQSYIIPPTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:192)
Bi-LT-1 LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISRLTWLQKPEKAPKRLIYATSSLDGVPSPRFSGS GSGDFTLTISSLQPEDFATYYCLQYASSPLTFGGGKTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPRKAVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:194)
Bi-LT-3 HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSKASGYTLTDYYMNMWRQAPGGLEWMGVINPYNGDT SYNQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDAVYYCVRDDGYVYHYFDYWGQGLTIVTSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKLSLSLKGKGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSKASGYTFTSYMHWVR QAPGGLEWMGIINPSGGRTSYAQMFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDAVYYCARD REEQWPVGGFDYWGQGLTIVTSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASV TQSPSSLSASVGDRTITCRASQSIRRYLNWYQKPKGKAPKLLIYSASNLQSGVPSRFSGSGS GSDFTLTISSLQPEDFATYYCQSYIIPPTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:193)
Bi-LT-3 LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISRLTWLQKPEKAPKRLIYATSSLDGVPSPRFSGS GSGDFTLTISSLQPEDFATYYCLQYASSPLTFGGGKTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPRKAVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:194)

Фиг. 32

Улучшенные scFv-фрагменты антитела против TIGIT с удлинёнными
линкерами 4xG4S или 6xG4S, слитые с антителом против LAG3,
обеспечивают сохранение биоактивности как TIGIT, так и LAG3

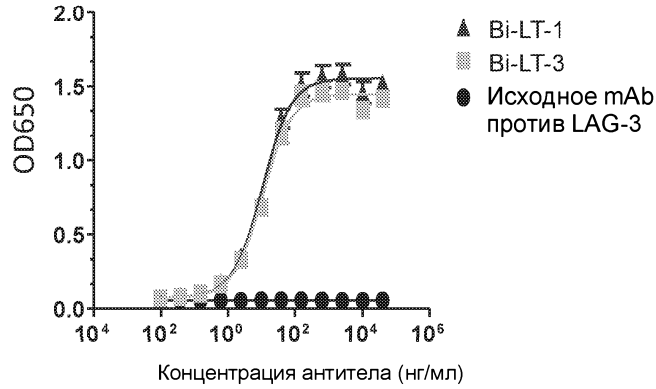


Фиг. 33А



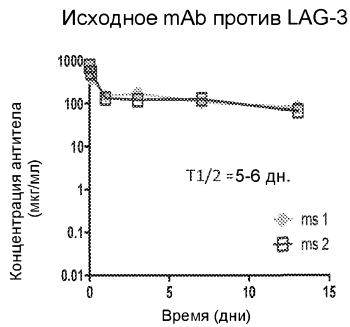
Фиг. 33В

Bi-LT-1 и Bi-LT-3 могут одновременно связываться с LAG-3 и TIGIT



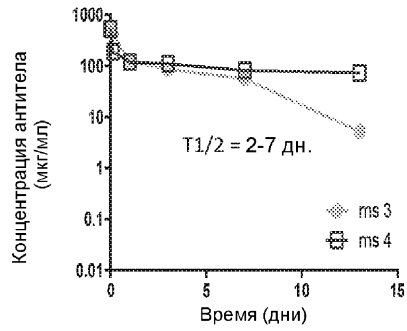
Фиг. 34

Антитела с улучшенными scFv-фрагментами антитела против TIGIT, слитыми с антителом против LAG-3, обладают хорошими фармакокинетическими свойствами, подобными не слитому антителу против LAG3



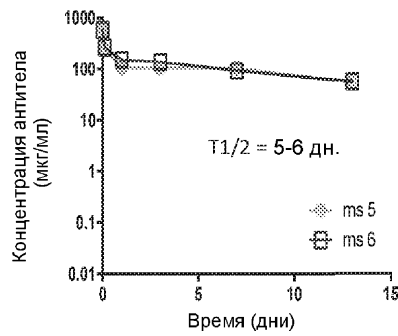
Фиг. 35А

Эталонное (BM) mAb против LAG-3



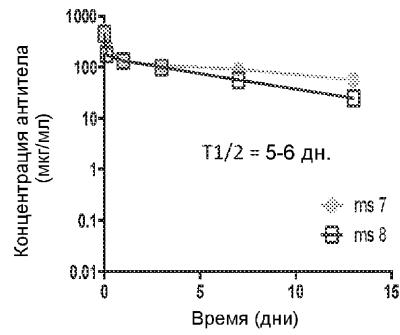
Фиг. 35B

Bi-LT-1



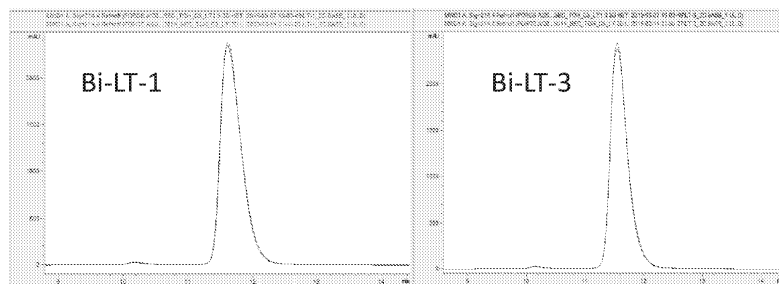
Фиг. 35C

Bi-LT-3

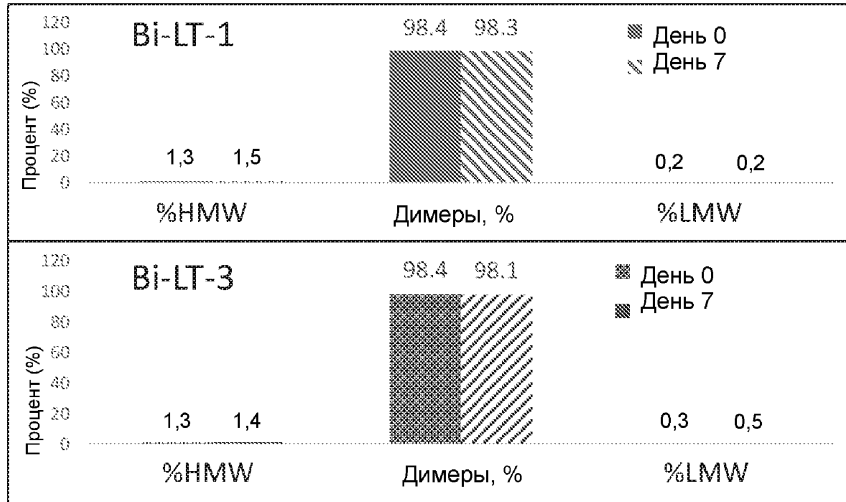


Фиг. 35D

Bi-LT-1 and Bi-LT-3 с улучшенными scFv-фрагментами антитела против TIGIT являются гомогенными и обладают хорошей стабильностью при 4 °C в течение 7 дней

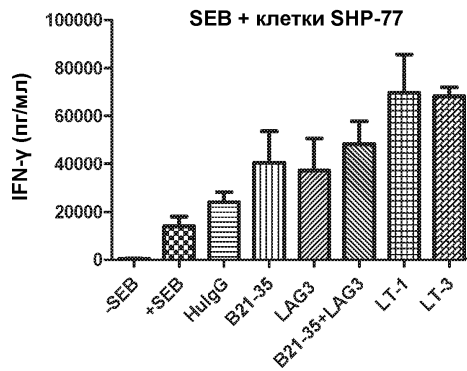


Фиг. 36А

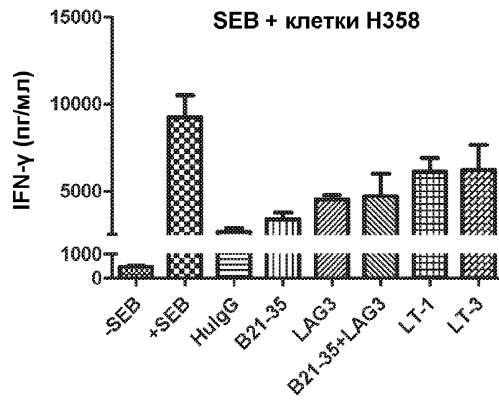


Фиг. 36В

Bi-LT-1 и Bi-LT-3 являются более активными по сравнению с комбинацией исходных антител против TIGIT и LAG-3, поскольку они индуцируют более высокий уровень IFN-γ в анализе SEB-стимулированных МКПК

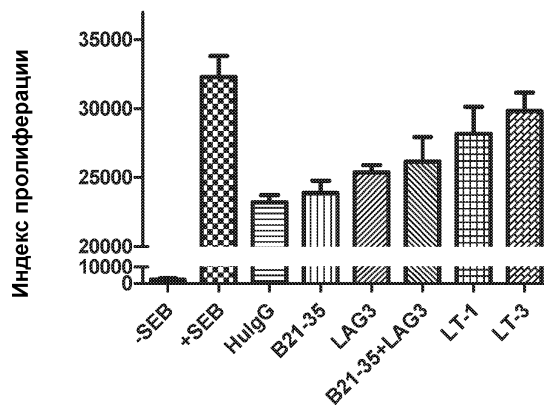


Фиг. 37А



Фиг. 37В

Bi-LT-1 и Bi-LT-3 являются более активными по сравнению с комбинацией исходных антител против TIGIT и LAG-3 для индукции пролиферации Т-клеток в SEB-стимулированных МКПК



Фиг. 38

SEQ ID NO	Последовательность	Описание/Замечания
216	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSIT	T-01 HFR1
217	WIRQPPGKLEWIG	T-01, 02, 06, 07 HFR2
218	RVTISVDTSKIQFSLKLSVTAADTAVYYCAR	T-01, 06 HFR3
219	WGQGTSTVTVSS	T-01 HFR4
220	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITC	T-01, 03, 04, 05, 06, 07, 10 LFR1
221	WHQKPKGKAPKLLIY	T-01 LFR2
222	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQSYSTP	T-01, 02 LFR3
223	FGGGTKLEIKR	T-01, 06 LFR4
224	QVKLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTVSGYSIT	T-02 HFR1
225	RVTISVDTSKIQFSLKLSVTAADTAVYSCAR	T-02 HFR3
226	WGQGLTVTVSA	T-02, 06, 07 HFR4
227	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVIPC	T-02 LFR1
228	WYQKPKGKAPKLLIY	T-02, 03, 04, 05, 06, 07, 10 LFR2
229	FGEGTKLEIK	T-02 LFR4
230	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFT	T-03, 04 HFR1
231	WVQQAPGKLEW/MG	T-03, 04, 05 HFR2
232	RVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCAT	T-03, 04 HFR3
233	WGQGLTITVSA	T-03 HFR4
234	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	T-03, 05, 06, 10 LFR3
235	FGAGTKLELK	T-03, 05 LFR4
236	WGQGLTVTVSS	T-04, 05, 08, 09, 10 HFR4
237	GVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDIATYYC	T-04 LFR3
238	FGAGTKLEIK	T-04 LFR4
239	EVQLKQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFT	T-05 HFR1
240	RVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYFCAR	T-05 HFR3
241	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGVS	T-06 HFR1
242	EVQLQESGPGLVKPSDITLSTCAVSGYSIT	T-07 HFR1
243	RVTMSVDTSKIQFSLKLSVTAVDTAVYYCTR	T-07 HFR3
244	GAPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFGIYYC	T-07 LFR3
245	FGGGTKLEFK	T-07 LFR4
246	QVQLVQSGSELKPGASVKVSKASGYTFT	T-08 HFR1
247	WVRQAPGQGLEW/MG	T-08, 10 HFR2
248	RFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCAR	T-08 HFR3
249	DVVMTQSPSLPVTLGQPASISC	T-08 LFR1
250	WFQQRPGQSPRVLIY	T-08 LFR2
251	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC	T-08 LFR3
252	FGRGKLEIK	T-08 LFR4
253	QVTLKESGPTLVKPTQTLTCTFSGFSL	T-09 HFR1
254	WIRQPPGKALEWLA	T-09 HFR2
255	RLTITKDTSKNQVLTMTNMDPVDATYYCAR	T-09 HFR3
256	QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTC	T-09 LFR1
257	WVQKPKGQLEFRGLIG	T-09 LFR2
258	WVPARFSGSLIGDKAALTLGVPQPEDEAEYFC	T-09 LFR3
259	FGGGTKLTVL	T-09 LFR4
260	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT	T-10 HFR1
261	RVTMTIRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR	T-10 HFR3
262	FGQGTKVEIK	T-10 LFR4

Фиг. 39А

SEQ ID NO	Последовательность	Описание/Замечания
263	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	PD-01 HFR1
264	WVRQAPGKGLEWVS	PD-01 HFR2
265	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK	PD-01 HFR3
266	WGQGTSTVTVSS	PD-01 HFR4
267	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITC	PD-01 LFR1
268	WYQQKPGKAPKLLIY	PD-01, 02, 03, 04; PL-02, 03 LFR2
269	GVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYC	PD-01, 02, 03, 04 LFR3
270	FGGGTKLEIK	PD-01; PL-05 LFR4
271	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASDYFTF	PD-02, 03, 04 HFR1
272	WLRQAPGQGLEWMG	PD-02 HFR2
273	RTTSTRDTSISTAYMELSLRSDDTVYYCTR	PD-02 HFR3
274	WGQGTTLVTVSS	PD-02, 04, 05, 06; PL-01, 02, 03, 04, 06, 07, 08 HFR4
275	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC	PD-02, 04 LFR1
276	FGGGTKVEIK	PD-02, 04, 05; PL-01, 04, 06, 07, 08 LFR4
277	WVRQAPGQGLEWMG	PD-03, 04, 05, 06; PL-02, 03, 04, 08 HFR2
278	RVTSTRDTSISTAYMELSLRSDDTVYYCA	PD-03, 04; PL-01 HFR3
279	WGQGTTLVTVSS	PD-03; PL-05 HFR4
280	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC	PD-03 LFR1
281	FGAGTKLDLK	PD-03 LFR4
282	FGGGTKVEIK	PD-04, 05; PL-01, 04, 06, 07, 08 LFR4
283	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFT	PD-05, 06; PL-01, 02, 03, 04, 06, 07, 08 HFR1
284	RVTMTRDTSISTAYMELSLRSEDVAVYYCAR	PD-05 HFR3
285	DIIVLTQSPASLAVSPGQRATITC	PD-05 LFR1
286	WYQQKPGQPPLLIY	PD-05 LFR2
287	GVPARFSGSGSDFTLTINPVEANDTANYC	PD-05 LFR3
288	RVTLTADTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCA	PD-06 HFR3
289	DIQMTQSPSFLSASVGDRTITC	PD-06 LFR1
290	WYQQKPGKAPKALIIY	PD-06 LFR2
291	GVPSRFSGSGSGETFTLTISLQPEDFATYYC	PD-06 LFR3
292	FGGGTKLEIK	PD-06 LFR4

Фиг. 39В

SEQ ID NO	Последовательность	Описание/Замечания
293	WMKQAPGGGLEWMG	PL-01 HFR2
294	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC	PL-01, 02, 03, 04, 08 LFR1
295	WYQKPGKAPKLLIK	PL-01, 04, 08 LFR2
296	GVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYFC	PL-01, 04, 08 LFR3
297	KATMTRDKSSSTVYMESSLRSEDATVYYCAR	PL-02 HFR3
298	GVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDATYFC	PL-02, 03 LFR3
299	FGGQTKVEIK	PL-02, 03 LFR4
300	RVTMTRDTSISTAYMELSLRSDDTAVYYCAR	PL-03, 08 HFR3
301	RVTMTRDTSSTVYMESSLRSEDATVYYCAR	PL-04 HFR3
302	DVQLQESGPGLVKPSQSLTCTVTGYSIT	PL-05 HFR1
303	WIRQFPGNKLEWMG	PL-05 HFR2
304	RISITRDTSKNQFFLQLNSVTEDTATYYCAN	PL-05 HFR3
305	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSIIC	PL-05 LFR1
306	WYQKPGKAPKLLIF	PL-05 LFR2
307	GVPRFTGSGSDYTLTISVQAEDLALYYC	PL-05 LFR3
308	WVRQAPGQRLEWMGW	PL-06, 07 HFR2
309	RVTITRDTASTAYMELSLRSEDATVYYCAR	PL-06, 07 HFR3
310	DIQMTQSPSSLSAFVGDRTITC	PL-06 LFR1
311	WYQKPGKAPKLLIH	PL-06 LFR2
312	GVPSRFSGSGSGRDFTLTISLQPEDATYYC	PL-06 LFR3
313	EIVLTQSPVTLSPGERATLSC	PL-07 LFR1
314	WYLQKPGQAPRLLIK	PL-07 LFR2
315	IPARFSGSGSDFTLTISLEPEDFAVYYC	PL-07 LFR3
316	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTLT	2L2A.1 HFR1
317	WMRQAPGGGLEWMG	2L2A.1 HFR2
318	RVTMTRDTSSTVYMESSLRSEDATVYYCVR	2L2A.1 HFR3
319	WGQGLTVTVSS	2L2A.1, 2L2A.6, 3L1A HFR4
320	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC	2L2A.1, 2L2A.6, 2L27B LFR1
321	WLQKPKKAPKRLIY	2L2A.1 LFR2
322	GVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYC	2L2A.1, 2L2A.6, 2L27B LFR3
323	FGGQTKVEIK	2L2A.1, 2L2A.6, 2L27B LFR4
324	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFT	2L2A.6 HFR1
325	WVRQAPGGGLEWMG	2L2A.6 HFR2
326	RVTMTRDTSSTVYMESSLRSEDATVYYCAR	2L2A.6 3L1A HFR3
327	WLQKPKKAPKRLIY	2L2A.6, 3L1A LFR2
328	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGFTFS	2L27B HFR1
329	WVRQAPGGGLEWMGL	2L27B HFR2
330	RVTMTRDTSSTVYMESSLRSEDATVYFC	2L27B HFR3
331	FDYWDGYYVEHFDYWGQGLTVTVSS	2L27B HFR4
332	WYQKPKKAPKRLIY	2L27B LFR2
333	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTF	3L1A HFR1
334	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITC	3L1A LFR1
335	WLAWYQKPKKAPKLLIY	3L1A LFR2
336	GVPSRFSGSGGTEFTLTISLQPDFATYYC	3L1A LFR3
337	FGGQTKLEIK	3L1A LFR4

Фиг. 39С

