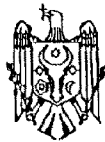




MD 4733 C1 2021.07.31

## REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4733** (13) **C1**  
(51) Int.Cl: *A61K 39/00* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01)  
*A61P 37/02* (2006.01)  
*C07K 16/28* (2006.01)

## (12) BREVET DE INVENȚIE

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>(21) Nr. depozit: a 2017 0032<br/>(22) Data depozit: 2015.08.17</p> <p>(31) Nr.: 62/038912; 62/126733<br/>(32) Data: 2014.08.19; 2015.03.02<br/>(33) Țara: US; US<br/>(41) Data publicării cererii:<br/>2017.08.31, BOPI nr. 8/2017</p>                                                                                       | <p>(45) Data publicării hotărârii de<br/>acordare a brevetului:<br/>2020.12.31, BOPI nr. 12/2020</p> <p>(85) 2017.03.16<br/>(86) PCT/US2015/045447, 2015.08.17<br/>(87) WO 2016/028656 A1, 2016.02.25</p> |
| <p>(71) Solicitant: MERCK SHARP &amp; DOHME CORP., US<br/>(72) Inventatori: WILLIAMS Sybil M.G., US; LAFACE Drake, US; FAYADAT-DILMAN<br/>Laurence, US; RAGHUNATHAN Gopalan, US; LIANG Linda, US; SEGHEZZI<br/>Wolfgang, US<br/>(73) Titular: MERCK SHARP &amp; DOHME CORP., US<br/>(74) Mandatar autorizat: ANDRIEȘ Ludmila</p> |                                                                                                                                                                                                           |

## (54) Anticorpi anti-TIGIT

## (57) Rezumat:

1  
Invenția se referă la anticorpi anti-TIGIT, precum și la utilizarea acestor anticorpi în tratamentul afecțiunilor, cum ar fi o tumoare malignă și o boală infecțioasă.

2  
Secvențe: 167  
Revendicări: 30  
Figuri: 17

MD 4733 C1 2021.07.31

**(54) Anti-TIGIT antibodies****(57) Abstract:**

1

The invention relates to anti-TIGIT antibodies, as well as use of these antibodies in the treatment of diseases such as cancer and infectious disease.

2

Sequences: 167

Claims: 30

Fig.: 17

**(54) Антитела анти-TIGIT****(57) Реферат:**

1

Изобретение относится к антителам анти-TIGIT, а также к применению этих антител для лечения заболеваний, таких как злокачественная опухоль и инфекционное заболевание.

2

Последовательности: 167

П. формулы: 30

Фиг.: 17

**Descriere:****(Descrierea se publică în redacția solicitantului)**

5 Prezentă invenție se referă la anticorpi anti-TIGIT, precum și la utilizarea acestor anticorpi în tratamentul unor boli, cum ar fi o tumoră malignă și o boală infecțioasă.

Un factor-cheie în asigurarea imunoterapiei tumorilor a apărut odată cu descoperirea faptului că receptorii imunomodulatori inhibitori (IMR), care funcționează, de regulă, ca puncte de control imunitar pentru a menține auto-toleranța, dețin un rol esențial în capacitatea micromediilor tumorale de a se sustrage de la imunitate. Blocarea IMR-ilor inhibitorii pare să elibereze răspunsuri imune tumoral-specifice puternice mai eficient, decât stimularea directă a imunității tumorale prin activarea citokinelor sau prin vaccinuri antitumorale, iar această abordare are potențialul de a transforma terapia cancerului uman. În prezent, apare o importantă implicare și oportunitate pentru potențialul de a dezvolta noi antagoniști ai anticorpilor pentru alte IMR-uri și de a combina anticorpii antagoniști cu mai mult de o IMR cu scopul de a spori procentul de răspunsuri din cadrul studiilor clinice din domeniul oncologiei, precum și de a extinde indicațiile oncologice în care tratamentele de imunoterapie tumorală sunt eficiente.

15 În mod semnificativ, IMR-rile inhibitorii și liganzii care reglează imunitatea celulară sunt de obicei supraexprimați pe celulele tumorale și pe macrofagele asociate tumorii (MAT). În special, supraexprimarea PD-L1 în tumori este asociată cu epuizarea celulelor T tumoral-specifice și cu un prognostic slab. Blocarea ligării PD-1/PD-L1 în studiile clinice au drept rezultat răspunsuri de regresie durabilă a tumorii la o parte semnificativă din pacienți. Un raport recent a demonstrat faptul că co-exprimarea PD-1 și a unui alt inhibitor IMR (TIM-3) în celulele T CD8+ specifice tumorii, obținute de la un pacient cu melanom, a fost asociată cu fenotipuri de epuizare mai disfuncțională a celulelor T, comparativ cu celulele exprimate de oricare dintre IMR separat. De asemenea, mai multe rapoarte în care s-au utilizat modele tumorale pre-clinice au demonstrat faptul că blocarea unor multiple IMR-uri, inclusiv PD-1, TIM-3, LAG-3 și CTLA-4, a indus mai eficient răspunsuri antitumorale decât antagonistul unui singur PD-1. Aceste rezultate subliniază importanța de a investiga în continuare căile IMR.

30 TIGIT (imunoreceptor de celule T cu domeniile Ig și ITIM) reprezintă un receptor imunomodulator, exprimat în principal pe celulele T activate și pe celulele NK. TIGIT este cunoscut, de asemenea, sub numele de VSIG9; VSTM3; și WUCAM. Structura sa prezintă un domeniu de imunoglobulină extracelular, o regiune transmembranară de tip 1 și două motive ITIM. TIGIT face parte din rețeaua co-stimulatoare, care constă din receptori imunomodulatori pozitivi (CD226) și negativi (TIGIT) pe celulele T și liganzi exprimați pe APC-uri (CD155 și CD112).

35 O caracteristică importantă a structurii TIGIT este prezența unui motiv inhibitor pe bază pe tirozină imunoreceptor (ITIM) în domeniul cozii sale citoplasmice. Ca și în cazul PD-1 și CTLA-4, s-a presupus că domeniul ITIM în regiunea citoplasmică TIGIT este destinat să recruteze tirozin fosfatazele, cum ar fi SHP-1 și SHP-2, și ulterior să efectueze de-fosforilarea resturilor de tirozină cu ajutorul motivelor de activare a imunoreceptorului (ITAM) bazate pe tyrosină pe subunitățile receptorului de celule T (TCR). Astfel, legarea TIGIT prin intermediul receptor-liganzilor CD155 și CD112, exprimați de către celulele tumorale, sau TAMS, poate contribui la suprimarea semnalizării TCR și activării celulelor T, ceea ce este esențial pentru dezvoltarea unei imunități antitumorale eficiente. Astfel, un anticorp antagonist, specific pentru TIGIT, poate inhiba suprimarea indusă de CD155 și CD112 a răspunsurilor din partea celulelor T și poate spori imunitatea antitumorală. Scopul prezentei invenții este de a obține un anticorp anti-TIGIT care să poată fi utilizat pentru tratamentul tumorii maligne, fie separat, fie în combinație cu alți reactivi.

50 Invenția de față se referă la anticorpii anti-TIGIT și fragmente acestora de legare a antigenului cuprinzând caracteristicile structurale și funcționale menționate în continuare.

Intr-o variantă de realizare, prezenta invenție se referă la un anticorp sau la un fragment al acestuia de legare a antigenului, care se leagă la TIGIT uman cuprinzând: CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu care conține secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 3, 79, 80, 81, 82, 83, 59, 90, 140, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166 sau 167.

55 Intr-o variantă de realizare, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului posedă, în mod opțional, cel puțin una dintre următoarele caracteristici: (i) se leagă la TIGIT uman cu o valoare a  $K_D$  de la aproximativ  $1 \times 10^{-9}$  M până la aproximativ  $1 \times 10^{-12}$  M, determinată prin intermediul rezonanței plasmonice de rezonanță (de exemplu, BIACORE) sau printr-o tehnică

similară (de exemplu, KinExA sau OCTET); (ii) reacționează încrucișat cu TIGIT cynomolgus și rhesus; (iii) blochează legarea TIGIT uman cu CD155 uman și CD112 uman; (iv) sporește activarea celulelor T; (v) stimulează producția de IL-2 și IFN $\gamma$  de către celulele T antigen-specifice; (vi) blochează inducția de suprimare a activării celulelor T, indusă prin legarea TIGIT cu liganzii inrudiți CD155 și CD112.

Intr-o altă variantă de realizare, prezenta invenție se referă la un anticorp sau la un fragment al acestuia de legare a antigenului, care se leagă la TIGIT uman, cuprinzând: CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor care include secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 6, 62, 74, 75, 76, 77, 78 sau 93. Intr-o variantă de realizare a invenției, în mod opțional, anticorpul posedă cel puțin una dintre următoarele caracteristici: (i) se leagă la TIGIT uman cu o valoare a  $K_D$  de la aproximativ  $1 \times 10^{-9}$  M până la aproximativ  $1 \times 10^{-12}$  M, determinată prin rezonanța plasmonică de suprafață (de exemplu, BIACORE) sau printr-o tehnică similară (de exemplu, KinExA sau OCTET); (ii) reacționează încrucișat cu TIGIT cynomolgus și rhesus; (iii) blochează legarea TIGIT uman la CD155 uman și CD112 uman; (iv) sporește activarea celulelor T; (v) stimulează producția de IL-2 și IFN $\gamma$  de către celulele T antigen-specifice; (vi) blochează inducția de suprimare a activării celulelor T, indusă prin legarea TIGIT la liganzii inrudiți CD155 și CD112.

În următoarea variantă de realizare, invenția în cauză se referă la un anticorp sau la un fragment al acestuia de legare a antigenului, care se leagă la TIGIT uman, cuprinzând: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu care conține secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 1; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu care include secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 2; și (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi SECV. ID NR. 140. Intr-o variantă de realizare a invenției, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare la antigen cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu care include secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 1; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu care include secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 2; și (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 3, 79, 80, 81, 82 sau 83. Într-o variantă de realizare a prezentei invenții, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu care conține secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 1; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu care conține secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 2; și (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi SECV. ID NR. 3. Intr-o variantă de realizare, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului posedă, în mod opțional, cel puțin una dintre următoarele caracteristici: (i) se leagă la TIGIT uman cu o valoare a  $K_D$  de la aproximativ  $1 \times 10^{-9}$  M până la aproximativ  $1 \times 10^{-12}$  M, determinată prin rezonanța plasmonică de suprafață (de exemplu, BIACORE) sau printr-o tehnică similară (de exemplu, KinExA sau OCTET); (ii) reacționează încrucișat cu TIGIT cynomolgus și rhesus; (iii) blochează legarea TIGIT uman la CD155 uman și CD112 uman; (iv) sporește activarea celulelor T; (v) stimulează producția de IL-2 și IFN $\gamma$  de către celulele T antigen-specifice; (vi) blochează inducția de suprimare a activării celulelor T, indusă prin legarea TIGIT la liganzii inrudiți CD155 și CD112.

Intr-o altă variantă de realizare, invenția în cauză se referă la un anticorp sau la un fragment al acestuia de legare a antigenului, care se leagă cu TIGIT uman, cuprinzând: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu care include secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 57; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu care include secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 58; și (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 59. Intr-o variantă de realizare a invenției, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului posedă, în mod opțional, cel puțin una dintre următoarele caracteristici: (i) se leagă la TIGIT uman cu valoarea  $K_D$  de la aproximativ  $1 \times 10^{-9}$  M până la aproximativ  $1 \times 10^{-12}$  M, determinată prin rezonanța plasmonică de suprafață (de exemplu, BIACORE) sau printr-o tehnică similară (de exemplu, KinExA sau OCTET); (ii) reacționează încrucișat cu TIGIT cynomolgus și rhesus; (iii) blochează legarea TIGIT uman la CD155 uman și CD112 uman; (iv) sporește activarea celulelor T; (v) stimulează producția de IL-2 și IFN $\gamma$  de către celulele T antigen-specifice; (vi) blochează inducția de suprimare a activării celulelor T, indusă prin legarea TIGIT cu liganzii inrudiți CD155 și CD112.

Intr-o altă variantă de realizare, invenția propusă se referă la un anticorp sau la un fragment al acestuia de legare a antigenului, care se leagă cu TIGIT uman, cuprinzând: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu care include secvența de aminoacizi din SECV ID NR. 88; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu care include secvența de aminoacizi din SECV ID NR. 147; și (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din

[illegible]

aminoacizi din SECV. ID NR. 134; și (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 163. Într-o variantă de realizare a invenției, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu care conține secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 88; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 134; și (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 164. Într-o variantă de realizare, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu care conține secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 88; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 134; și (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 165. Într-o variantă de realizare a invenției, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu care conține secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 88; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 134; și (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 166. Într-o variantă de realizare a invenției propuse, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu care conține secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 88; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 134; și (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 167. Într-o variantă de realizare, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului posedă, în mod opțional, cel puțin una dintre următoarele caracteristici: (i) se leagă la TIGIT uman cu o valoare a  $K_D$  de la aproximativ  $1 \times 10^{-9}$  M până la aproximativ  $1 \times 10^{-12}$  M, determinată prin rezonanță plasmonică de suprafață (de exemplu, BIACORE) sau printr-o tehnică similară (de exemplu, KinExA sau OCTET); (ii) reacționează încrucișat cu TIGIT cynomolgus și rhesus; (iii) blochează legarea TIGIT uman la CD155 uman și CD112 uman; (iv) sporește activarea celulelor T; (v) stimulează producția de IL-2 și IFN $\gamma$  de către celulele T antigen-specifice; (vi) blochează inducția de suprimare a activării celulelor T, indusă prin legarea TIGIT cu liganzii înrudiți CD155 și CD112.

Într-o altă variantă de realizare, invenția de față se referă la un anticorp sau la un fragment al acestuia de legare a antigenului care se leagă cu TIGIT uman cuprinzând: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor care include secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 4; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 141; și (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 142. Într-o variantă de realizare a invenției, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor incluzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 4; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 5, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71 sau 72; și (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 6, 74, 75, 76, 77 sau 78. Într-o variantă de realizare a invenției, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor care conține secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 4; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 5; și (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 6. Într-o variantă de realizare a invenției, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului posedă, în mod opțional, cel puțin una dintre următoarele caracteristici: (i) se leagă la TIGIT uman cu o valoare a  $K_D$  de la aproximativ  $1 \times 10^{-9}$  M până la aproximativ  $1 \times 10^{-12}$  M, determinată prin rezonanță plasmonică de suprafață (de exemplu, BIACORE) sau printr-o tehnică similară (de exemplu, KinExA sau OCTET); (ii) reacționează încrucișat cu TIGIT cynomolgus și rhesus; (iii) blochează legarea TIGIT uman la CD155 uman și CD112 uman; (iv) sporește activarea celulelor T; (v) stimulează producția de IL-2 și IFN $\gamma$  de către celulele T antigen-specifice; (vi) blochează inducția de suprimare a activării celulelor T, indusă prin legarea TIGIT cu liganzii înrudiți CD155 și CD112.

Într-o altă variantă de realizare, invenția propusă se referă la un anticorp sau la un fragment al acestuia de legare a antigenului care se leagă la TIGIT uman cuprinzând: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor care conține secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 60; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 61; și (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 62. Într-o variantă de realizare, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului posedă, în mod opțional, cel puțin una dintre următoarele caracteristici: (i) se leagă la TIGIT uman cu o valoare a  $K_D$  de la aproximativ  $1 \times 10^{-9}$  M până la aproximativ  $1 \times 10^{-12}$  M,

determinată prin rezonanță plasmonică de suprafață (de exemplu, BIACORE) sau printr-o tehnică similară (de exemplu, KinExA sau OCTET); (ii) reacționează încrucișat cu TIGIT cynomolgus și rhesus; (iii) blochează legarea TIGIT uman la CD155 uman și CD112 uman; (iv) sporește activarea celulelor T; (v) stimulează producția de IL-2 și IFN $\gamma$  de către celulele T antigen-specifice; (vi) blochează inducția de suprimare a activării celulelor T, indusă prin legarea TIGIT cu liganzii înrudiți CD155 și CD112.

Intr-o altă variantă de realizare, invenția dată se referă la un anticorp sau la un fragment al acestuia de legare a antigenului care se leagă la TIGIT uman cuprinzând: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 91; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 93. Intr-o variantă de realizare a invenției, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 91; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 92, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121 sau 122; și (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 93. Intr-o variantă de realizare, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor care include secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 91; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 92; și (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 93. Într-o variantă de realizare, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului posedă, în mod opțional, cel puțin una dintre următoarele caracteristici: (i) se leagă la TIGIT uman cu o valoare a  $K_D$  de la aproximativ  $1 \times 10^{-9}$  M până la aproximativ  $1 \times 10^{-12}$  M, determinată prin rezonanță plasmonică de suprafață (de exemplu, BIACORE) sau printr-o tehnică similară (de exemplu, KinExA sau OCTET); (ii) reacționează încrucișat cu TIGIT cynomolgus și rhesus; (iii) blochează legarea TIGIT uman la CD155 uman și CD112 uman; (iv) sporește activarea celulelor T; (v) stimulează producția de IL-2 și IFN $\gamma$  de către celulele T antigen-specifice; (vi) blochează inducția de suprimare a activării celulelor T, indusă prin legarea TIGIT cu liganzii înrudiți CD155 și CD112.

Intr-o altă variantă de realizare, prezenta invenție se referă la un anticorp sau la un fragment al acestuia de legare a antigenului care se leagă la TIGIT uman cuprinzând: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu care include secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 1; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 2; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 140; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 4; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 141; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 142. Într-o variantă de realizare a invenției, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu care conține secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 1; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 2; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 3, 79, 80, 81, 82 sau 83; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 4; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 5, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72 sau 73; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 6, 74, 75, 76, 77 sau 78. Intr-o variantă de realizare a invenției, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 1; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 2; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 3; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 4; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 5; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 6. Intr-o variantă de realizare, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului este umanizat. Intr-o variantă de realizare, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde regiunea variabilă a lanțului greu, selectată din grupul format din SECV. ID NR. 9-24, 37-47, 143 și 144; și regiunea variabilă a lanțului ușor, selectată din grupul constând din SECV. ID Nr. 25-30, 48-52, 146 și 147. Într-o variantă de realizare, anticorpul sau

fragmentul acestuia de legare a antigenului posedă, în mod opțional, cel puțin una dintre următoarele caracteristici: (i) se leagă la TIGIT uman cu o valoare a  $K_D$  de la aproximativ  $1 \times 10^{-9}$  M până la aproximativ  $1 \times 10^{-12}$  M, determinată prin rezonanță plasmonică de suprafață (de exemplu, BIACORE) sau printr-o tehnică similară (de exemplu, KinExA sau OCTET); (ii) reacționează încrucișat cu TIGIT cynomolgus și rhesus; (iii) blochează legarea TIGIT uman la CD155 uman și CD112 uman; (iv) sporește activarea celulelor T; (v) stimulează producția de IL-2 și IFN $\gamma$  de către celulele T antigen-specifice; (vi) blochează inducția de suprimare a activării celulelor T, indusă prin legarea TIGIT cu liganzii înrudiți CD155 și CD112.

Intr-o altă variantă de realizare, invenția de față se referă la un anticorp sau la un fragment al acestuia de legare a antigenului, care se leagă la TIGIT uman cuprinzând: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 1; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR. 2; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 3, 79, 80, 81, 82 sau 83; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 4; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 5, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72 sau 73; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID Nr. 6, 74, 75, 76, 77 sau 78; caracterizată prin aceea că anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde regiunea variabilă a lanțului greu deținând cel puțin 90% 95%, 96%, 97%, 98% sau 99% din identitatea regiunii variabile a lanțului greu, selectată din grupul constând din SECV. ID NR. 9-24 sau 37-47, și regiunea variabilă a lanțului ușor care posedă cel puțin 90%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99% din identitatea regiunii variabile a lanțului greu, selectat din grupul constând din SECV. ID NR. 25-30 sau 48-52. În exemplul de realizare a invenției, menționat mai sus, variantele de secvență se întâlnesc în regiunile cadru. Într-o variantă de realizare, anticorpul se leagă la TIGIT uman cu o valoare a  $K_D$  de la aproximativ  $1 \times 10^{-9}$  M până la aproximativ  $1 \times 10^{-12}$  M, determinată prin rezonanță plasmonică de suprafață (de exemplu, BIACORE) sau printr-o tehnică similară (de exemplu, KinExA sau OCTET).

Intr-o altă variantă de realizare, invenția de față se referă, de asemenea, la un anticorp sau la un fragment al acestuia de legare a antigenului care se leagă cu TIGIT uman cuprinzând: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu care conține secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 1; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV ID NR. 2; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 3; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 4; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 5; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 6. Într-o variantă de realizare, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde 1, 2 sau 3 substituții de aminoacizi în CDR-ul lanțului greu (SECV. ID NR. 1-3) sau în CDR-ul lanțului ușor (SECV. ID NR. 3-6). Într-o variantă de realizare, anticorpul cuprinde o substituție de aminoacizi în CDR-ul de lanț greu din SECV. ID NR. 3, caracterizată prin aceea că substituția este făcută la poziția 13W, și caracterizată prin aceea că restul 13W este substituit cu: F, Y, I, V sau L. Într-o variantă de realizare a invenției, anticorpul cuprinde două substituții de aminoacizi în CDR-ul lanțului ușor din SECV. ID NR. 5, în care substituțiile sunt efectuate la poziția 3-4, și în care resturile 3N și 4S sunt substituite cu: SN, SS, ST, TT, SY, NQ, GS, SQ și DS. Într-o variantă de realizare, anticorpul cuprinde o substituție de aminoacizi în CDR-ul lanțului ușor din SECV. ID NR. 6, în care substituția este făcută la poziția 7, și în care restul 7W este înlocuit cu: F, Y, I, V sau L. Secvențele VH ale SECV. ID NR. 9-24 și 37-47 dețin CDR-urile din SECV. ID NR. 1-3; și secvențele VL ale SECV. ID NR. 25-30 și 48-52 dețin CDR-urile din SECV. ID NR. 4-6. În unele variante de realizare, substituțiile efectuate în CDR-urile descrise mai sus pot fi realizate în CDR-urile corespunzătoare ale secvențelor VH din SECV. ID NR. 9-24 și 37-47, și în CDR-urile secvențelor VL din SECV. ID NR. 25-30 și 48-52. Într-o variantă de realizare, anticorpul se leagă la TIGIT uman cu o valoare a  $K_D$  de la aproximativ  $1 \times 10^{-9}$  M până la aproximativ  $1 \times 10^{-12}$  M, determinată prin rezonanță plasmonică de suprafață (de exemplu, BIACORE) sau printr-o tehnică similară (de exemplu, KinExA sau OCTET).

Intr-o altă variantă de realizare, invenția se referă la un anticorp sau la un fragment al acestuia de legare a antigenului care se leagă la TIGIT uman cuprinzând: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu care conține secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 57; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 58; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV.

ID NR. 59; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 60; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 61; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 62. Într-o variantă de realizare a invenției, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului este umanizat. Într-o variantă de realizare, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde 1, 2 sau 3 substituții de aminoacizi în CDR-urile lanțului greu (SECV. ID NR. 57-59) sau în CDR-urile lanțului ușor (SECV. ID NR. 60-62) și păstrează una sau mai multe dintre caracteristicile sale funcționale. Într-o variantă de realizare, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului posedă, în mod opțional, cel puțin una dintre următoarele caracteristici funcționale: (i) se leagă la TIGIT uman cu o valoare a  $K_D$  de la aproximativ  $1 \times 10^{-9}$  M până la aproximativ  $1 \times 10^{-12}$  M, determinată prin rezonanță plasmonică de suprafață (de exemplu, BIACORE) sau printr-o tehnică similară (de exemplu, KinExA sau OCTET); (ii) reacționează încrucișat cu TIGIT cynomolgus și rhesus; (iii) blochează legarea TIGIT uman la CD155 uman și CD112 uman; (iv) sporește activarea celulelor T; (v) stimulează producția de IL-2 și IFN $\gamma$  de către celulele T antigen-specifice; (vi) blochează inducția de suprimare a activării celulelor T, indusă prin legarea TIGIT cu liganzii înrudiți CD155 și CD112.

Într-o altă variantă de realizare, invenția de față se referă, de asemenea, la un anticorp sau la un fragment al acestuia de legare a antigenului care se leagă la TIGIT uman cuprinzând: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 88; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 147; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 153; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 91; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 148; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 93. Într-o variantă de realizare a invenției, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 88; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 89, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 134 sau 135; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 90, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166 sau 167; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID Nr. 91; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 92, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121 sau 122; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 93. Într-o variantă de realizare a invenției, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 88; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 89, 134 sau 135; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 90; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 91; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 92; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 93. Într-o variantă de realizare a invenției propuse, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 88; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 134; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 90; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 91; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 92; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 93. Într-o variantă de realizare a invenției, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului este umanizat. Într-o variantă de realizare, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 88; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 134; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 154; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 91; (v) CDR2 a

[illegible]

[illegible]

CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 93. Intr-o variantă de realizare a invenției, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului este umanizat. Intr-o variantă de realizare, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului posedă, în mod opțional, cel puțin una dintre următoarele caracteristici: (i) se leagă la TIGIT uman cu o valoare a  $K_D$  de la aproximativ  $1 \times 10^{-9}$  M până la aproximativ  $1 \times 10^{-12}$  M, determinată prin rezonanță plasmonică de suprafață (de exemplu, BIACORE) sau printr-o tehnică similară (de exemplu, KinExA sau OCTET); (ii) reacționează încrucișat cu TIGIT cynomolgus și rhesus; (iii) blochează legarea TIGIT uman la CD155 uman și CD112 uman; (iv) sporește activarea celulelor T; (v) stimulează producția de IL-2 și IFN $\gamma$  de către celulele T antigen-specifice; (vi) blochează inducția de suprimare a activării celulelor T, indusă prin legarea TIGIT cu liganzii înrudiți CD155 și CD112.

Intr-o variantă de realizare, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului se leagă la TIGIT uman și cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu care conține secvența de aminoacid din SECV. ID NR. 88; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacid din SECV. ID NR. 89; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacid din SECV ID NR. 90; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacid din SECV. ID NR. 91; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 92; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 93. Intr-o variantă de realizare a invenției, anticorpul cuprinde o substituție de aminoacizi în CDR2 a lanțului greu din SECV. ID NR. 89, caracterizată prin aceea că substituția este făcută la poziția 7, și caracterizată prin aceea că restul D este substituit cu: R, L K, F, S, Y sau V. Într-o altă variantă de realizare, anticorpul cuprinde o substituție de aminoacizi în CDR2 al lanțului greu din SECV. ID NR. 89, caracterizată prin aceea că substituția este făcută la poziția 8, și caracterizată prin aceea că restul G este substituit cu: R, N, Q, E, L, K, S, Y sau V. Într-o altă variantă de realizare, anticorpul cuprinde o substituție de aminoacizi în CDR2 a lanțului greu din SECV. ID NR. 89, caracterizată prin aceea că substituția este făcută la poziția 12, caracterizată prin aceea că restul N este substituit cu: A sau S. Într-o altă variantă de realizare, anticorpul cuprinde o substituție de aminoacizi în CDR2 al lanțului greu din SECV. ID NR. 89, caracterizată prin aceea că substituția este făcută la poziția 13, caracterizată prin aceea că restul E este substituit cu Q. Intr-o altă variantă de realizare a invenției, anticorpul cuprinde o substituție de aminoacizi în CDR2 a lanțului greu din SECV. ID NR. 89, caracterizată prin aceea că substituția este făcută la poziția 16, caracterizată prin aceea că restul K este substituit cu Q. Într-o altă variantă de realizare a invenției, anticorpul cuprinde o substituție de aminoacizi în CDR2 a lanțului greu din SECV. ID NR. 89, caracterizată prin aceea că restul de aminoacizi 12 este substituit cu: A sau S, restul de aminoacizi 13 este substituit cu Q și restul de aminoacid 16 este substituit cu Q. Intr-o variantă de realizare, anticorpul cuprinde o substituție de aminoacizi în CDR3 al lanțului greu din SECV. ID NR. 90, caracterizată prin aceea că restul de aminoacizi 6 este substituit cu: A, D, E, F, G, I, K, N, Q, R, S, T, V sau Y. Intr-o altă variantă de realizare, anticorpul cuprinde o substituție de aminoacizi în CDR al lanțului ușor din SECV. ID NR. 92, caracterizată prin aceea că substituția este făcută la poziția 1, și caracterizată prin aceea că restul N este substituit cu A, Y, W, S, T, R, H, G, I sau V. Într-o altă variantă de realizare, anticorpul cuprinde o substituție de aminoacid în CDR al lanțului ușor din SECV. ID NR. 92, caracterizată prin aceea că substituția este făcută la poziția 2, și caracterizată prin aceea că restul A este substituit cu N, I, L, T, V. Intr-o variantă de realizare, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului este umanizat. Intr-o variantă de realizare, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului posedă, în mod opțional, cel puțin una dintre următoarele caracteristici: (i) se leagă la TIGIT uman cu o valoare a  $K_D$  de la aproximativ  $1 \times 10^{-9}$  M până la aproximativ  $1 \times 10^{-12}$  M, determinată prin rezonanță plasmonică de suprafață (de exemplu, BIACORE) sau printr-o tehnică similară (de exemplu, KinExA sau OCTET); (ii) reacționează încrucișat cu TIGIT cynomolgus și rhesus; (iii) blochează legarea TIGIT uman la CD155 uman și CD112 uman; (iv) sporește activarea celulelor T; (v) stimulează producția de IL-2 și IFN $\gamma$  de către celulele T antigen-specifice; (vi) blochează inducția de suprimare a activării celulelor T, indusă prin legarea TIGIT cu liganzii înrudiți CD155 și CD112.

Intr-o altă variantă de realizare a sa, invenția se referă, de asemenea, la un anticorp sau la un fragment al acestuia de legare a antigenului care se leagă la TIGIT uman cuprinzând: o regiune variabilă a lanțului greu, care conține CDR1, CDR2 și CDR3 din oricare dintre SECV. ID NR. 124-129 și/sau o regiune variabilă a lanțului ușor cuprinzând CDR1, CDR2 și CDR3 din oricare dintre SECV. ID NR. 130-133. Intr-o variantă de realizare, invenția se referă, de

asemenea, la un anticorp izolat sau la un fragment al acestuia de legare a antigenului, care se leagă la TIGIT uman cuprinzând: o regiune variabilă a lanțului greu, selectată din grupul constând din SECV. ID NR: 124-129 și/sau o regiune variabilă a lanțului , selectată din grupul constând din SECV. ID NR. 130-133. Intr-o variantă de realizare a invenției, restul D din poziția

5 56 a oricăreia dintre SECV. ID Nr: 124-129 poate fi substituit cu R, L, K, F, S, Y sau V. Intr-o altă variantă de realizare, restul G din poziția 57 a oricăreia dintre SECV. ID NR: 124-129 poate fi substituit cu R, N, Q, E, L, K, S, Y sau V. Intr-o variantă de realizare, restul W din poziția 104 a oricăreia dintre SECV. ID NR: 124-129 poate fi substituit cu A, D, E, F, G, I, K, N, Q, R, S, T, V sau Y. Intr-o altă variantă de realizare, restul N din poziția 50 a oricăreia dintre SECV. ID Nr:

10 130-133 poate fi substituit cu A, Y, W, S, T, I sau V. Intr-o altă variantă de realizare a prezentei invenții, restul A de din poziția 51 a oricăreia dintre SECV. ID NR: 130-133 este substituit cu N, I, L, T sau V. Intr-o variantă de realizare, invenția propusă se referă la un anticorp izolat sau la un fragment al acestuia de legare a antigenului care se leagă la TIGIT uman cuprinzând: o regiune variabilă a lanțului greu care cuprinde SECV. ID NR. 128 sau o regiune variabilă a lanțului ușor care cuprinde SECV. ID NR. 132. Intr-o altă variantă de realizare, invenția de față se referă la un anticorp izolat sau la un fragment al acestuia de legare a antigenului care se leagă la TIGIT uman cuprinzând: o regiune variabilă a lanțului greu care cuprinde SECV. ID NR. 128 sau o regiune variabilă a lanțului ușor care cuprinde SECV. ID NR. 133. Într-o altă variantă de realizare, invenția se referă, de asemenea, la un anticorp izolat sau la un fragment al acestuia de

20 legare a antigenului care se leagă la TIGIT uman cuprinzând: o regiune variabilă a lanțului greu care cuprinde SECV. ID NR. 127 sau o regiune variabilă a lanțului ușor care cuprinde SECV. ID NR. 130. Intr-o variantă de realizare, invenția se referă la un anticorp izolat sau la un fragment al acestuia de legare la antigen care se leagă la TIGIT uman cuprinzând: o regiune variabilă a lanțului greu care cuprinde SECV. ID NR. 128 și o regiune variabilă a lanțului ușor care cuprinde SECV. ID NR. 132. Intr-o altă variantă de realizare, invenția se referă, de asemenea, la un anticorp izolat sau la un fragment al acestuia de legare a antigenului care se leagă la TIGIT uman cuprinzând: o regiune variabilă a lanțului greu care cuprinde SECV. ID NR. 128 și o regiune variabilă a lanțului ușor care cuprinde SECV. ID NR. 133. Într-o altă formă de realizare, invenția de față se referă, de asemenea, la un anticorp izolat sau la un fragment al acestuia de

30 legare a antigenului care se leagă la TIGIT uman cuprinzând: o regiune variabilă a lanțului greu care cuprinde SECV. ID NR. 127 și o regiune variabilă a lanțului ușor care cuprinde SECV. ID NR. 130. In unele variante de realizare, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului se leagă la TIGIT uman cu o valoare a  $K_D$  de la aproximativ  $1 \times 10^{-9}$  M până la aproximativ  $1 \times 10^{-12}$  M, determinată prin rezonanță plasmonică de suprafață (de exemplu, BIACORE) sau printr-o tehnică similară (de exemplu, KinExA sau OCTET).

35 Intr-o altă variantă de realizare, invenția se referă, de asemenea, la un anticorp sau la un fragment al acestuia de legare a antigenului care se leagă la TIGIT uman cuprinzând: (i) o regiune variabilă a lanțului greu care conține CDR1, CDR2 și CDR3 ale oricăreia dintre SECV. ID NR. 124-129, caracterizat prin aceea că regiunea variabilă a lanțului greu cuprinde cel puțin

40 90%, 95% 96%, 97%, 98% sau 99% identitate cu oricare dintre SECV. ID NR. 124-129 și/sau (ii) o regiune variabilă a lanțului ușor cuprinzând CDR1, CDR2 și CDR3 ale oricăreia dintre SECV. ID NR. 130-133, caracterizat prin aceea că regiunea variabilă a lanțului ușor cuprinde cel puțin 90%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99% identitate cu oricare dintre SECV. ID NR. 130-133. Intr-o altă variantă de realizare, invenția propusă se referă, de asemenea, la un anticorp sau la un

45 fragment al acestuia de legare a antigenului care se leagă la TIGIT uman cuprinzând: (i) o regiune variabilă a lanțului greu care cuprinde CDR1, CDR2 și CDR3 ale SECV. ID NR. 128, caracterizată prin aceea că regiunea variabilă a lanțului greu cuprinde 90%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99% identitate cu SECV. ID NR. 128 și/sau (ii) o regiune variabilă a lanțului ușor care cuprinde CDR1, CDR2 și CDR3 ale SECV. ID NR. 132, caracterizată prin aceea că regiunea variabilă a lanțului ușor cuprinde cel puțin 90%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99% identitate cu SECV. ID NR. 132. Intr-o altă variantă de realizare, prezenta invenție se referă, de asemenea, la un anticorp sau la un fragment al acestuia de legare a antigenului care se leagă la TIGIT uman cuprinzând: (i) o regiune variabilă a lanțului greu care conține CDR1, CDR2 și CDR3 ale SECV. ID NR. 128, caracterizată prin aceea că regiunea variabilă a lanțului greu cuprinde cel puțin

50 90%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99% identitate cu SECV. ID NR. 128 și/sau (ii) o regiune variabilă a lanțului ușor care cuprinde CDR1, CDR2 și CDR3 ale SECV. ID NR. 133, caracterizată prin aceea că regiunea variabilă a lanțului ușor cuprinde cel puțin 90%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99% identitate cu SECV. ID NR. 133. Intr-o altă variantă de realizare, invenția se referă, de asemenea, la un anticorp sau la un fragment al acestuia de legare a antigenului care se

leagă la TIGIT uman cuprinzând: (i) o regiune variabilă a lanțului greu care conține CDR1, CDR2 și CDR3 din SECV. ID NR. 127, caracterizată prin aceea că regiunea variabilă a lanțului greu cuprinde cel puțin 90%, 95%, 96%, 97%, 98% sau de 99% identitate cu SECV. ID Nr. 127 și/sau (ii) o regiune variabilă a lanțului ușor care cuprinde CDR1, CDR2 și CDR3 din SECV. ID NR. 130, caracterizată prin aceea că regiunea variabilă a lanțului ușor cuprinde cel puțin 90%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99% identitate cu SECV. ID NR. 130. În aceste variante de realizare, variantele admise ale secvenței se produc în regiunile cadru ale lanțurilor variabile. În unele variante de realizare, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului se leagă la TIGIT uman cu o valoare a  $K_D$  de la aproximativ  $1 \times 10^{-9}$  M până la aproximativ  $1 \times 10^{-12}$  M, determinată prin rezonanță plasmonică de suprafață (de exemplu, BIACORE) sau printr-o tehnică similară (de exemplu, KinExA sau OCTET).

Intr-o altă variantă de realizare, invenția se referă la un anticorp sau la un fragment al acestuia de legare a antigenului cuprinzând: un lanț variabil greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 7. și/sau un lanț variabil ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 8, caracterizat prin aceea că anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului se leagă la TIGIT uman. Într-o variantă de realizare, anticorpul se leagă la TIGIT uman cu o valoare a  $K_D$  de la aproximativ  $1 \times 10^{-9}$  M până la aproximativ  $1 \times 10^{-12}$  M, determinată prin rezonanță plasmonică de suprafață (de exemplu, BIACORE) sau printr-o tehnică similară (de exemplu, KinExA sau OCTET).

Intr-o altă variantă de realizare, invenția de față se referă la un anticorp sau la un fragment al acestuia de legare a antigenului cuprinzând: un lanț variabil greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 143 și/sau un lanț variabil ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 145, caracterizat prin aceea că anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului se leagă la TIGIT uman. Într-o variantă de realizare a invenției, anticorpul se leagă la TIGIT uman cu o valoare a  $K_D$  de la aproximativ  $1 \times 10^{-9}$  M până la aproximativ  $1 \times 10^{-12}$  M, determinată prin rezonanță plasmonică de suprafață (de exemplu, BIACORE) sau printr-o tehnică similară (de exemplu, KinExA sau OCTET).

Intr-o altă formă de realizare, invenția se referă la un anticorp sau la un fragment al acestuia de legare a antigenului cuprinzând: un lanț variabil greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 144 și/sau un lanț variabil ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 146, caracterizat prin aceea că anticorpul sau fragmentul acestuia de legare la antigen se leagă la TIGIT uman. Într-o variantă, anticorpul se leagă la TIGIT uman cu o valoare a  $K_D$  de la aproximativ  $1 \times 10^{-9}$  M până la aproximativ  $1 \times 10^{-12}$  M, determinată prin rezonanță plasmonică de suprafață (de exemplu, BIACORE) sau printr-o tehnică similară (de exemplu, KinExA sau OCTET).

Intr-o altă variantă de realizare, invenția propusă se referă la un anticorp sau la un fragment al acestuia de legare a antigenului cuprinzând: un lanț variabil greu care conține secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 63 și/sau un lanț variabil ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 64, caracterizat prin aceea că anticorpul sau fragmentul acestuia de legare la antigen se leagă la TIGIT uman. Într-o variantă, anticorpul se leagă la TIGIT uman cu o valoare a  $K_D$  de la aproximativ  $1 \times 10^{-9}$  M până la aproximativ  $1 \times 10^{-12}$  M, determinată prin rezonanță plasmonică de suprafață (de exemplu, BIACORE) sau printr-o tehnică similară (de exemplu, KinExA sau OCTET).

Intr-o altă variantă de realizare, invenția se referă la un anticorp sau la un fragment al acestuia de legare a antigenului cuprinzând: un lanț variabil greu care conține secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 94 și / sau un lanț variabil ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 95, caracterizat prin aceea că anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului se leagă la TIGIT uman. Într-o variantă de realizare, anticorpul se leagă la TIGIT uman cu o valoare a  $K_D$  de la aproximativ  $1 \times 10^{-9}$  M până la aproximativ  $1 \times 10^{-12}$  M, determinată prin rezonanță plasmonică de suprafață (de exemplu, BIACORE) sau printr-o tehnică similară (de exemplu, KinExA sau OCTET).

Intr-o variantă de realizare, invenția se referă, de asemenea, la un anticorp izolat sau la un fragment al acestuia de legare a antigenului care se leagă la TIGIT uman cuprinzând: o regiune variabilă a lanțului greu care cuprinde SECV. ID NR. 149 și / sau o regiune variabilă a lanțului ușor care cuprinde SECV. ID NR. 151. Într-o variantă, anticorpul se leagă la TIGIT uman cu o valoare a  $K_D$  de la aproximativ  $1 \times 10^{-9}$  M până la aproximativ  $1 \times 10^{-12}$  M, determinată prin rezonanță plasmonică de suprafață (de exemplu, BIACORE) sau printr-o tehnică similară (de exemplu, KinExA sau OCTET).

Intr-o variantă de realizare, invenția se referă, de asemenea, la un anticorp izolat sau la un fragment al acestuia de legare a antigenului care se leagă la TIGIT uman cuprinzând: o regiune variabilă a lanțului greu care conține SECV. ID NR. 150 și / sau o regiune variabilă a lanțului ușor care cuprinde SECV. ID NR. 152. Într-o variantă de realizare, anticorpul se leagă la TIGIT uman cu o valoare a  $K_D$  de la aproximativ  $1 \times 10^{-9}$  M până la aproximativ  $1 \times 10^{-12}$  M, determinată prin rezonanță plasmonică de suprafață (de exemplu, BIACORE) sau printr-o tehnică similară (de exemplu, KinExA sau OCTET).

Intr-o altă variantă de realizare, invenția se referă la un anticorp sau la un fragment al acestuia de legare a antigenului care se leagă cu același epitop al TIGIT uman ca și un anticorp care cuprinde lanțul variabil greu al SECV. ID NR. 7 și lanțul variabil ușor al SECV. ID NR. 8, caracterizat prin aceea că anticorpul sau fragmentul acestuia de legare la antigen posedă cel puțin una dintre următoarele caracteristici: (i) se leagă la TIGIT uman cu o valoare a  $K_D$  de la aproximativ  $1 \times 10^{-9}$  M până la aproximativ  $1 \times 10^{-12}$  M, determinată prin rezonanță plasmonică de suprafață (de exemplu, BIACORE) sau printr-o tehnică similară (de exemplu, KinExA sau OCTET), (ii) blochează legarea TIGIT uman la CD155 uman și CD112 uman; (iii) sporește activarea celulelor T; (iv) stimulează producția de IL-2 și IFN $\gamma$  de către celulele T antigen-specifice; (v) blochează inducția de suprimare a activării celulelor T, indusă prin legarea TIGIT cu liganzi înrudiți CD155 și CD112. Într-o variantă de realizare, anticorpul cuprinde cel puțin 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99% identitate a secvenței cu lanțul variabil greu și / sau lanțul variabil ușor ale oricăreia dintre SECV. ID Nr. 7-30 sau 37-52. Într-o altă variantă de realizare, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 sau 30 de substituții de aminoacizi în regiunea variabilă a lanțului greu din oricare dintre SECV. ID NR. 7, 9-24 și 37-47 și / sau în regiunea variabilă a lanțului ușor din oricare dintre SECV. ID NR. 8, 25-30 și 48-52.

Intr-o variantă de realizare, prezenta invenție se referă la un anticorp sau la un fragment al acestuia de legare a antigenului care se leagă la un epitop de TIGIT uman cuprinzând cel puțin una dintre următoarele regiuni: resturile 54-57 ale SECV. ID NR. 31, resturile 68-70 ale SECV. ID NR. 31 și resturile 76-81 ale SECV. ID NR. 31. Într-o variantă de realizare, invenția se referă la un anticorp sau la un fragment al acestuia de legare a antigenului care se leagă la un epitop de TIGIT uman conținând resturile: 54-57, 68-70 și 76-81 ale SECV. ID NR. 31.

Intr-o altă variantă de realizare, invenția se referă la un anticorp sau la un fragment al acestuia de legare a antigenului care se leagă la același epitop al TIGIT uman ca și un anticorp care cuprinde regiunea variabilă a lanțului greu al SECV. ID NR. 63 și regiunea variabilă a lanțului ușor al SECV. ID NR. 64, caracterizat prin aceea că anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului posedă cel puțin una dintre următoarele caracteristici: (i) se leagă la TIGIT uman cu o valoare a  $K_D$  de la aproximativ  $1 \times 10^{-9}$  M până la aproximativ  $1 \times 10^{-12}$  M, determinată prin rezonanță plasmonică de suprafață (de exemplu, BIACORE) sau printr-o tehnică similară (de exemplu, KinExA sau OCTET), (ii) reacționează încrucișat cu TIGIT cynomolgus și rhesus; (iii) blochează legarea TIGIT uman la CD155 uman și CD112 uman; (iv) sporește activarea celulelor T; (v) stimulează producția de IL-2 și IFN $\gamma$  de către celulele T antigen-specifice; (vi) blochează inducția de suprimare a activării celulelor T, indusă prin legarea TIGIT cu liganzii înrudiți CD155 și CD112. Într-o variantă de realizare, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului posedă cel puțin 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99% identitate de secvență cu regiunea variabilă a lanțului greu al SECV. ID NR. 63 și / sau cu regiunea variabilă a lanțului ușor al SECV. ID NR. 64. Într-o altă formă de realizare, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 sau 30 substituții de aminoacizi în regiunea variabilă a lanțului greu al SECV. ID NR. 63 și / sau în regiunea variabilă a lanțului ușor al SECV. ID NR. 64. Într-o altă variantă de realizare, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde 1, 2 sau 3 substituții de aminoacizi în CDR-urile lanțului greu (SECV. ID NR. 57-59) sau în CDR-urile lanțului ușor (SECV. ID NR. 60-62).

Intr-o altă variantă de realizare, invenția se referă la un anticorp sau la un fragment al acestuia de legare a antigenului care se leagă la același epitop al TIGIT uman ca și un anticorp care cuprinde regiunea variabilă a lanțului greu al SECV. ID NR. 94 și regiunea variabilă a lanțului ușor al SECV. ID Nr. 95, caracterizat prin aceea că anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului posedă cel puțin una dintre următoarele caracteristici: (i) se leagă la TIGIT uman cu o valoare a  $K_D$  de la aproximativ  $1 \times 10^{-9}$  M până la aproximativ  $1 \times 10^{-12}$  M, determinată prin rezonanță plasmonică de suprafață (de exemplu, BIACORE) sau printr-o tehnică similară

(de exemplu, KinExA sau OCTET), (ii) reacționează încrucișat cu TIGIT cynomolgus și rhesus, (iii) blochează legarea TIGIT uman la CD155 uman și CD112 uman; (iv) sporește activarea celulelor T; (v) stimulează producția de IL-2 și IFN $\gamma$  de către celulele T antigen-specifice; (vi) blochează inducția de suprimare a activării celulelor T, indusă prin legarea TIGIT cu liganzii înrudiți CD155 și CD112. Într-o variantă, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde cel puțin 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99% identitate de secvență cu regiunea variabilă a lanțului greu al oricăreia dintre SECV. ID NR. 94 sau 124-129 și/sau cu regiunea variabilă a lanțului ușor al oricăreia dintre SECV. ID NR. 95 sau 130-133. Într-o altă variantă de realizare, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 sau 30 substituții de aminoacizi în regiunea variabilă a lanțului greu al oricăreia dintre SECV. ID NR. 94 sau 124-129 și/sau în regiunea variabilă a lanțului ușor al oricăreia dintre SECV. ID NR. 95 sau 130-133. Într-o altă variantă, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde 1, 2 sau 3 substituții de aminoacizi în CDR-urile regiunii variabile a lanțului greu (SECV. ID NR. 88-90) și / sau în CDR-urile regiunii variabile a lanțului ușor (SECV. ID NR. 91-93). Într-o altă variantă de realizare, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde CDR-urile lanțului greu din SECV. ID NR. 88, 134 și 90 și / sau CDR-urile lanțului ușor din SECV. ID NR. 91, 92 și 93.

Într-o variantă de realizare, invenția propusă se referă la un anticorp sau la un fragment al acestuia de legare a antigenului care se leagă la un epitop de TIGIT uman cuprinzând cel puțin una dintre următoarele regiuni: resturile 53-57, resturile 60-65, resturile 68-70, resturile 72-81, resturile 94-95 și resturile 109-119 ale SECV. ID NR. 31. Într-o variantă de realizare, invenția se referă la un anticorp sau un fragment al acestuia de legare a antigenului care se leagă la un epitop de TIGIT uman cuprinzând resturile: 53-57, 60-65, 68-70, 72-81, 94-95 și 109-119 din SECV. ID NR. 31.

Într-o altă variantă de realizare, invenția se referă la un anticorp sau un fragment al acestuia de legare a antigenului care blochează încrucișat legarea unui anticorp (sau care concurează cu anticorpul) cuprinzând regiunea variabilă a lanțului greu din SECV. ID NR. 7 și regiunea variabilă a lanțului ușor din SECV. ID NR. 8 la TIGIT uman, caracterizat prin aceea că anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului posedă cel puțin una dintre următoarele caracteristici: (i) se leagă la TIGIT uman cu o valoare a  $K_D$  de la aproximativ  $1 \times 10^{-9}$  M până la aproximativ  $1 \times 10^{-12}$  M, determinată prin rezonanță plasmonică de suprafață (de exemplu, BIACORE) sau printr-o tehnică similară (de exemplu, KinExA sau OCTET), (ii) reacționează încrucișat cu TIGIT cynomolgus și rhesus, (iii) blochează legarea TIGIT uman la CD155 uman și CD112 uman; (iv) sporește activarea celulelor T; (v) stimulează producția de IL-2 și IFN $\gamma$  de către celulele T antigen-specifice; (vi) blochează inducția de suprimare a activării celulelor T, indusă prin legarea TIGIT cu liganzii înrudiți CD155 și CD112. Într-o variantă de realizare, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare la antigen conține cel puțin 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, sau 99% identitate de secvență cu lanțul variabil greu sau lanțul variabil ușor ale SECV. ID Nr. 7-30 sau 37-52. Într-o altă variantă de realizare, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 sau 30 substituții de aminoacizi în regiunile variabile ale lanțurilor grele ale SECV. ID NR. 7, 9-24 și 37-47 sau în regiunile variabile ale lanțurilor ușoare ale SECV. ID NR. 8, 25-30 și 48-52. Într-o altă variantă de realizare, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde 1, 2 sau 3 substituții de aminoacizi în CDR-urile lanțului greu (SECV. ID NR. 1-3) sau în CDR-urile lanțului ușor (SECV. ID NR. 3-6).

Într-o altă variantă de realizare, invenția se referă la un anticorp sau un fragment al acestuia de legare a antigenului care blochează încrucișat legarea unui anticorp (sau care concurează cu un anticorp) cuprinzând regiunea variabilă a lanțului greu al SECV. ID NR. 63 și regiunea variabilă a lanțului ușor al SECV. ID NR. 64 la TIGIT uman, caracterizat prin aceea că anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului posedă cel puțin una dintre următoarele caracteristici funcționale: (i) se leagă la TIGIT uman cu o valoare a  $K_D$  de la aproximativ  $1 \times 10^{-9}$  M până la aproximativ  $1 \times 10^{-12}$  M, determinată prin rezonanță plasmonică de suprafață (de exemplu, BIACORE) sau printr-o tehnică similară (de exemplu, KinExA sau OCTET); (ii) reacționează încrucișat cu TIGIT cynomolgus și rhesus; (iii) blochează legarea TIGIT uman la CD155 uman și CD112 uman; (iv) sporește activarea celulelor T; (v) stimulează producția de IL-2 și IFN $\gamma$  a celulelor T antigen-specifice; (vi) blochează inducția de suprimare a activării celulelor T, indusă prin legarea TIGIT cu liganzii înrudiți CD155 și CD112. Într-o

variantă de realizare, anticorpul cuprinde cel puțin 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99% identitate de secvență cu regiunea variabilă a lanțului greu al SECV. ID NR. 63 sau cu regiunea variabilă a lanțului ușor al SECV. ID NR. 64. Într-o altă variantă de realizare, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 sau 30 substituții de aminoacizi în regiunea variabilă a lanțului greu al SECV. ID NR. 63 sau în regiunea variabilă a lanțului ușor al SECV. ID NR. 64. Într-o altă variantă, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde 1, 2 sau 3 substituții de aminoacizi în CDR-urile lanțului greu (SECV. ID NR. 57-59) sau în CDR-urile lanțului ușor (SECV. ID NR. 60-62).

Într-o altă variantă de realizare, invenția se referă la un anticorp sau la un fragment al acestuia de legare a antigenului care blochează încrucișat legarea unui anticorp (sau care concurează cu un anticorp) cuprinzând regiunea variabilă a lanțului greu al SECV. ID NR. 94 și regiunea variabilă a lanțului ușor al SECV. ID NR. 95 la TIGIT uman, caracterizat prin aceea că anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului posedă cel puțin una dintre următoarele caracteristici: (i) se leagă la TIGIT uman cu o valoare a  $K_D$  de la aproximativ  $1 \times 10^{-9}$  M până la aproximativ  $1 \times 10^{-12}$  M, determinată prin rezonanță plasmonică de suprafață (de exemplu, BIACORE) sau printr-o tehnică similară (de exemplu, KinExA sau OCTET); (ii) reacționează încrucișat cu TIGIT cynomolgus și rhesus; (iii) blochează legarea TIGIT uman la CD155 uman și CD112 uman; (iv) sporește activarea celulelor T; (v) stimulează producția de IL-2 și IFN $\gamma$  a celulelor T antigen-specifice; (vi) blochează inducția de suprimare a activării celulelor T, indusă prin legarea TIGIT cu liganzii înrudiți CD155 și CD112. Într-o variantă de realizare, anticorpul conține cel puțin 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99% identitate de secvență cu regiunea variabilă a lanțului greu al SECV. ID NR. 94 sau cu regiunea variabilă a lanțului ușor al SECV. ID NR. 95. Într-o altă variantă de realizare, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 sau 30 substituții de aminoacizi în regiunea variabilă a lanțului greu al oricăreia dintre SECV. ID NR. 94 sau 124-129 sau în regiunea variabilă a lanțului ușor al oricăreia dintre SECV. ID NR. 95 sau 130-133. Într-un alt exemplu de realizare, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde 1, 2 sau 3 substituții de aminoacizi în CDR-urile lanțului greu (SECV. ID NR. 88-90) sau în CDR-urile lanțului ușor (SECV. ID NR. 91-93). Într-o variantă de realizare, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde: regiunea variabilă a lanțului greu care conține SECV. ID NR. 128 și regiunea variabilă a lanțului ușor care conține SECV. ID NR. 132. Într-o altă variantă de realizare, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde: regiunea variabilă a lanțului greu conținând SECV. ID NR. 127 și regiunea variabilă a lanțului ușor conținând SECV. ID NR. 130. Într-o altă variantă de realizare, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde: regiunea variabilă a lanțului greu conținând SECV. ID NR. 128 și regiunea variabilă a lanțului ușor conținând SECV. ID NR. 133.

Într-o altă variantă de realizare, invenția se referă la un anticorp sau la un fragment al acestuia de legare a antigenului care se leagă la TIGIT uman cuprinzând regiunea variabilă a lanțului greu, selectată din grupul constând din oricare dintre SECV. ID NR. 9-24 și 37-47, și/sau regiunea variabilă a lanțului ușor, selectată din grupul constând din oricare dintre SECV. ID NR. 25-30 și 48-52. Într-o variantă de realizare, anticorpul cuprinde o substituție de aminoacizi în FR4 a lanțului greu, caracterizată prin aceea că substituția este făcută la poziția 122 a SECV. ID NR. 9-24 și 37-47, caracterizată prin aceea că restul M este substituit cu: V, L, A, R, N, P, Q, E, G, I, H, K, F, S, T, W sau Y. Într-o variantă de realizare, anticorpul cuprinde două substituții de aminoacizi în FR4 a lanțului greu, caracterizată prin aceea că substituțiile sunt efectuate la pozițiile 122 și 123 din SECV. ID NR. 9-24 și 37-47, în care resturile M și V sunt substituite cu T și L, respectiv.

Într-o altă variantă de realizare, invenția se referă la un anticorp sau la un fragment al acestuia de legare a antigenului care se leagă la TIGIT uman cuprinzând regiunea variabilă a lanțului greu, selectată din grupul constând din oricare dintre SECV. ID NR. 9-24 și 37-47 și/sau regiunea variabilă a lanțului ușor, selectată din grupul constând din oricare dintre SECV. ID NR. 25-30 și 48-52. Într-o variantă de realizare, anticorpul cuprinde o substituție de aminoacizi în FR4 a lanțului greu, caracterizat prin aceea că substituția este făcută la poziția 122 a SECV. ID NR. 9-24 și 37-47, caracterizat prin aceea că restul M este substituit cu: V, L, A, R, N, P, Q, E, G, I, H, K, F, S, T, W sau Y. Într-o variantă de realizare, anticorpul cuprinde două substituții de aminoacizi în FR4 a lanțului greu, caracterizat prin aceea că substituțiile sunt efectuate la

pozițiile 122 și 123 din SECV. ID NR. 9-24 și 37-47, caracterizat prin aceea că resturile M și V sunt substituie cu T și L, respectiv.

Intr-o variantă de realizare, invenția se referă la un anticorp izolat sau la un fragment al acestuia de legare a antigenului care se leagă la TIGIT uman cuprinzând: un lanț greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 7 sau o variantă a acestuia care cuprinde până la 30 substituții de aminoacizi și/sau un lanț ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 8 care cuprinde până la 12 substituții de aminoacizi. Într-o variantă de realizare, lanțul greu cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 7 conținând substituții de aminoacizi la una sau la mai multe poziții, selectate din grupul format din: 6, 9, 12, 15, 16, 17, 23, 25, 37, 39, 40, 43, 44, 45, 48, 67, 68, 70, 71, 79, 81, 83, 87, 88, 92, 94, 119, 122 și 123. Într-o variantă de realizare, lanțul greu cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 7 conținând substituții de aminoacizi la una sau la mai multe poziții, selectate din grupul format din: 6, 9, 12, 15, 16, 17, 23, 25, 37, 39, 40, 43, 44, 45, 48, 67, 68, 70, 71, 79, 81, 83, 87, 88, 92, 94, 110, 119, 122 și 123, caracterizat prin aceea că aminoacidul din poziția 6 poate prezenta E sau Q, aminoacidul din poziția 9 poate prezenta P sau A, aminoacidul din poziția 12 poate prezenta V sau L, aminoacidul din poziția 15 poate prezenta S sau P, aminoacidul din poziția 16 poate prezenta Q sau E sau G, aminoacidul din poziția 17 poate prezenta S sau T, aminoacidul din poziția 23 poate prezenta S sau T, aminoacidul din poziția 25 poate prezenta T sau S, aminoacidul din poziția 37 pot prezenta I sau V, aminoacidul din poziția 39 poate prezenta K sau Q, aminoacidul din poziția 40 poate prezenta F sau P, aminoacidul din poziția 43 poate prezenta N sau K, aminoacidul din poziția 44 poate prezenta K sau G, aminoacidul din poziția 45 poate prezenta M sau L, aminoacidul din poziția 48 poate prezenta M sau I, aminoacidul din poziția 67 poate prezenta I sau V, aminoacidul din poziția 68 poate prezenta S sau T, aminoacidul din poziția 70 poate prezenta T sau S, aminoacidul din poziția 71 poate prezenta R sau V, aminoacidul din poziția 79 poate prezenta F sau S, aminoacidul din poziția 81 poate prezenta Q sau K, aminoacidul din poziția 83 poate prezenta H sau S, aminoacidul din poziția 87 poate prezenta T sau A, aminoacidul din poziția 88 poate prezenta D sau A, aminoacidul din poziția 92 poate prezenta T sau V, aminoacidul din poziția 94 poate prezenta S sau Y, aminoacidul din poziția 110 poate prezenta W, F, Y, I, V sau L, aminoacidul din poziția 119 poate prezenta P sau Q, aminoacidul din poziția 122 poate prezenta M, V, L, A, R, N, P, Q, E, G, I, H, K, F, S, T, W sau Y, iar aminoacidul din poziția 123 poate prezenta V, T sau L. Într-o variantă de realizare, lanțul ușor cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 8 care cuprinde substituții de aminoacizi la una sau la mai multe poziții, selectate din grupul constând din: 10, 21, 22, 40, 42, 46, 52, 53, 58, 77, 83, 87, 95 și 106. Într-o variantă de realizare, lanțul ușor cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 8 care conține substituții de aminoacizi la una sau la mai multe poziții, selectate din grupul constând din: 10, 21, 22, 40, 42, 46, 52, 53, 58, 77, 83, 87, 95 și 106, caracterizat prin aceea că: aminoacidul din poziția 10 poate prezenta L sau S, aminoacidul din poziția 21 poate prezenta L sau I, aminoacidul din poziția 22 poate prezenta N sau T, aminoacidul din poziția 40 poate prezenta L sau P, aminoacidul din poziția 42 poate prezenta E sau K, aminoacidul din poziția 46 poate prezenta F sau L, aminoacidul din poziția 52 poate prezenta N, S, T, G sau D, aminoacidul din poziția 53 poate prezenta S, N, T, Y sau Q, aminoacidul din poziția 58 poate prezenta I sau V, aminoacidul din poziția 77 poate prezenta G sau S, aminoacidul din poziția 83 poate prezenta V sau F, aminoacidul din poziția 87 poate prezenta F sau Y, aminoacidul din poziția 95 poate prezenta W, F, Y, I, V sau L, iar aminoacidul din poziția 105 poate prezenta L sau I.

Intr-o altă variantă de realizare, prezenta invenție se referă la un anticorp sau la un fragment al acestuia de legare a antigenului care se leagă la TIGIT uman cuprinzând: un lanț greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 9 și/sau un lanț ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 25, caracterizat prin aceea că fiecare dintre lanțurile variabile poate cuprinde 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 sau 8 substituții de aminoacizi. Într-o variantă de realizare, anticorpul poate cuprinde mutații la pozițiile 27, 48, 67, 71, 83, 110, 122 și 123 din SECV. ID NR. 9. De exemplu, în raport cu SECV. ID NR. 9: aminoacidul din poziția 27 poate constitui G sau S; aminoacidul din poziția 48 poate constitui I sau M; aminoacidul din poziția 67 poate constitui V sau I; aminoacidul din poziția 71 poate constitui V sau R; aminoacidul din poziția 83 poate constitui S sau H; aminoacidul din poziția 110 poate constitui W, F, Y, I, V sau L; aminoacidul din poziția 122 poate constitui M, V, L, A, R, N, P, Q, E, G, I, H, K, F, S, T, W sau Y; și aminoacidul din poziția 123 poate constitui V, T sau L. Într-o altă variantă de realizare, anticorpul poate cuprinde mutații la pozițiile 46, 52, 53, 58 și 95 din SECV. ID NR. 25. De exemplu, în raport cu SECV. ID NR. 25, aminoacidul din poziția 46 poate constitui L sau F;

aminoacidul din poziția 52 poate constitui N, S, T, G sau D, aminoacidul din poziția 53 poate constitui S, N, T, Y sau Q; aminoacidul din poziția 58 poate constitui I sau V; aminoacidul din poziția 58 poate constitui V sau I; și aminoacidul din poziția 95 poate constitui W, F, Y, I, V sau L.

- 5           Intr-o variantă de realizare, invenția se referă la un anticorp sau la un fragment al acestuia de legare a antigenului care se leagă la TIGIT uman cuprinzând: un lanț greu care conține secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 94 sau o variantă a acesteia având până la 30 de substituții de aminoacizi, și un lanț ușor care conține secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 95 sau o variantă a acesteia având până la 18 substituții de aminoacizi. Într-un exemplu de
- 10 realizare, lanțul greu cuprinde o variantă a secvenței de aminoacizi din SECV. ID NR. 94 care conține substituții de aminoacizi la una sau la mai multe poziții, selectate din grupul format din: 5, 9, 11, 12, 16, 20, 38, 40, 44, 56, 57, 61, 62, 65, 67, 68, 72, 74, 76, 79, 85, 87, 89, 91, 92, 104 și 111. Într-un exemplu de realizare, lanțul greu cuprinde o variantă a secvenței de aminoacizi din SECV. ID NR. 94 având substituții de aminoacizi la una sau la mai multe poziții, selectate
- 15 din grupul constând din: 5, 9, 11, 12, 16, 20, 38, 40, 44, 56, 57, 61, 62, 65, 67, 68, 72, 74, 76, 79, 85, 87, 89, 91, 92, 104 și 111, caracterizat prin aceea că: aminoacidul din poziția 5 poate constitui Q sau V, aminoacidul din poziția 9 poate constitui P sau A, aminoacidul din poziția 11 poate constitui V sau L, aminoacidul din poziția 12 poate constitui V sau K, aminoacidul din poziția 16 poate constitui S sau A, aminoacidul din poziția 20 poate constitui M sau V,
- 20 aminoacidul din poziția 38 poate constitui K sau R, aminoacidul din poziția 40 poate constitui K sau A, aminoacidul din poziția 44 poate constitui G sau R, aminoacidul din poziția 56 poate constitui D, R, L, K, F, S, Y sau V, aminoacidul din poziția 57 poate constitui G, R, N, Q, E, L, K, S, Y sau V, aminoacidul din poziția 61 poate constitui N, A sau S, aminoacidul din poziția 62 poate constitui E sau Q, aminoacidul din poziția 65 poate constitui K sau Q aminoacidul din
- 25 poziția 67 poate constitui R sau K, aminoacidul din poziția 68 poate constitui A sau V, aminoacidul din poziția 72 poate constitui S sau R, aminoacidul din poziția 74 poate constitui K sau T, aminoacidul din poziția 76 poate constitui S, I, A sau T, aminoacidul din poziția 79 poate constitui A sau V, aminoacidul din poziția 85 poate constitui R sau S, aminoacidul din poziția 87 poate constitui T sau R, aminoacidul din poziția 89 poate constitui D sau E, aminoacidul din
- 30 poziția 91 poate constitui S sau T, aminoacidul din poziția 92 poate constitui A sau V, aminoacidul din poziția 104 poate constitui W, A, D, E, F, G, I, K, N, Q, R, S, T, V sau Y, iar aminoacidul din poziția 111 poate constitui A sau Q. Într-un exemplu de realizare, lanțul ușor cuprinde o variantă a secvenței de aminoacizi din SECV. ID NR. 95 cuprinzând substituții de aminoacizi la una sau la mai multe poziții, selectate din grupul constând din: 9, 17, 18, 40, 43,
- 35 45, 48, 50, 51, 70, 72, 74, 76, 83, 84, 100, 103 și 106. Într-un exemplu de realizare, lanțul ușor cuprinde o variantă a secvenței de aminoacizi din SECV. ID NR. 95 conținând substituții de aminoacizi la una sau la mai multe poziții, selectate din grupul constând din: 9, 17, 18, 40, 43, 45, 48 50, 51, 70, 72, 74, 76, 83, 84, 100, 103 și 106, caracterizat prin aceea că aminoacidul din poziția 9 poate prezenta A sau S, aminoacidul din poziția 17 poate prezenta E sau D,
- 40 aminoacidul din poziția 18 poate prezenta T sau R, aminoacidul din poziția 40 poate prezenta Q sau P, aminoacidul din poziția 43 poate prezenta S, A sau V, aminoacidul din poziția 45 poate prezenta Q sau K, aminoacidul din poziția 48 poate prezenta V sau I, aminoacidul din poziția 50 poate prezenta N, A, Y, W, S, T, I sau V, aminoacidul din poziția 51 poate prezenta A, N, I, L, T sau V, aminoacidul din poziția 70 poate prezenta Q sau D, aminoacidul din poziția 72 poate
- 45 prezenta S sau T, aminoacidul din poziția 74 poate prezenta K sau T, aminoacidul din poziția 76 poate prezenta N sau S, aminoacidul din poziția 83 poate prezenta F sau V, aminoacidul din poziția 84 poate prezenta G sau A, aminoacidul din poziția 100 poate prezenta A sau Q, aminoacidul din poziția 103 poate prezenta T sau R și aminoacidul din poziția 106 poate prezenta L sau I.
- 50           Intr-o variantă de realizare, invenția se referă la un anticorp sau un fragment al acestuia de legare a antigenului care se leagă la TIGIT uman cuprinzând: un lanț greu care conține secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 124 sau o variantă a acesteia cuprinzând până la 10 substituții de aminoacizi și/sau un lanț ușor care conține secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 130 sau o variantă a acesteia cuprinzând până la 5 substituții de aminoacizi. Într-o altă variantă de
- 55 realizare, invenția se referă la un anticorp sau un fragment al acestuia de legare a antigenului care se leagă la TIGIT uman cuprinzând regiunea variabilă a lanțului greu din SECV. ID NR. 124 sau o variantă a acesteia, caracterizat prin aceea că varianta cuprinde substituții la una sau la mai multe poziții, selectate din grupul constând din: 16, 44, 56, 57, 61, 72, 74, 76, 79, 85, 89, 92 și 104. Într-o altă variantă de realizare, invenția se referă la un anticorp sau la un fragment al

- acestui de legare a antigenului care se leagă la TIGIT uman cuprinzând regiunea variabilă a lanțului greu din SECV. ID NR. 124 sau o variantă a acesteia care conține substituții la una sau la mai multe poziții, selectate din grupul constând din: 16, 44, 56, 57, 61, 72, 74, 76, 79, 85, 89, 92 și 104, caracterizat prin aceea că aminoacidul din poziția 16 poate constitui A sau S,
- 5 aminoacidul din poziția 44 poate constitui R sau G, aminoacidul din poziția 56 poate constitui D, R, L, K, F, S, Y sau V, aminoacidul din poziția 57 poate constitui G, R, N, Q, E, L, K, S, Y sau V, aminoacidul din poziția 61 poate constitui S sau A, aminoacidul din poziția 72 poate constitui R sau S, aminoacidul din poziția 74 poate constitui T sau K, aminoacidul din poziția 76 poate constitui A sau T sau I, aminoacidul din poziția 79 poate constitui A sau V, aminoacidul din
- 10 poziția 85 poate constitui S sau R, aminoacidul din poziția 89 poate constitui E sau D, aminoacidul din poziția 92 poate constitui A sau V, iar aminoacidul din poziția 104 poate constitui W, A, D, E, F, G, I, K, N, Q, R, S, T, V sau Y. Într-o altă variantă de realizare, invenția propusă se referă la un anticorp sau un fragment al acestuia de legare a antigenului care se leagă la TIGIT uman cuprinzând regiunea variabilă a lanțului ușor din SECV. ID NR. 130 sau o
- 15 variantă a acesteia care conține substituții la una sau la mai multe poziții, selectate din grupul constând din: 43, 50, 51, 70 și 83. Într-o altă variantă de realizare, invenția dată se referă la un anticorp sau un fragment al acestuia de legare a antigenului care se leagă la TIGIT uman cuprinzând regiunea variabilă a lanțului ușor din SECV ID NR. 130 sau o variantă a acesteia care conține substituții la una sau la mai multe poziții, selectate din grupul
- 20 și 83, caracterizat prin aceea că aminoacidul din poziția 43 poate prezenta S, A sau V, aminoacidul din poziția 50 poate prezenta N, A, Y, W, S, T, I sau V, aminoacidul din poziția 51 poate prezenta A, N, I, L, T sau V, aminoacidul din poziția 70 poate prezenta Q sau D, iar aminoacidul din poziția 83 poate prezenta F sau V.
- În oricare dintre variantele de realizare, menționate mai sus, anticorpul sau fragmentul
- 25 acestuia de legare a antigenului este izolat.
- În oricare dintre variantele de realizare, menționate mai sus, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului este un anticorp recombinant.
- În oricare dintre variantele de realizare, menționate mai sus, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului este un anticorp cu lungime deplină.
- 30 În oricare dintre variantele de realizare, menționate mai sus, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției, poate cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu constând din: (a) oricare dintre regiunile variabile ale lanțurilor grele descrise mai sus și (b) o peptidă lider (de exemplu, peptidă lider din SECV. ID NR. 53). În oricare dintre variantele de realizare, menționate mai sus, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului,
- 35 conform invenției, poate cuprinde o regiune variabilă a lanțului ușor constând din: (a) oricare dintre regiunile variabile ale lanțurilor ușoare descrise anterior și (b) o peptidă lider (de exemplu, peptidă lider din SECV. ID Nr. 54).
- În oricare dintre variantele de realizare, menționate mai sus, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției, constituie un anticorp care cuprinde oricare
- 40 dintre lanțurile variabile grele descrise mai sus și oricare domeniu constant de lanț greu uman. Într-o variantă de realizare, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției, se referă la izotipul IgG și cuprinde domeniul constant de lanț greu uman al IgG1, IgG2, IgG3 sau IgG4 umane. Într-o variantă de realizare, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției, cuprinde domeniul constant de lanț greu uman al IgG1
- 45 umane (SECV. ID NR. 86) sau o variantă a acestuia, caracterizat prin aceea că varianta conține până la 20 de substituții de aminoacizi modificate. Într-o variantă de realizare, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției, prezintă un anticorp care cuprinde domeniul constant al lanțului greu IgG1 uman, caracterizat prin aceea că domeniul constant conține secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 86. Într-o variantă de realizare,
- 50 anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției, cuprinde domeniul constant al lanțului greu IgG1 uman, caracterizat prin aceea că domeniul constant IgG1 este afucozilat. Într-o variantă de realizare, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției, cuprinde domeniul constant al lanțului greu IgG4 uman sau o variantă a acestuia, caracterizat prin aceea că varianta conține până la 20 de substituții de
- 55 aminoacizi modificate. Într-o altă variantă de realizare, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției, cuprinde domeniul constant al lanțului greu IgG4 uman, caracterizat prin aceea că aminoacidul din poziția 228 (folosind sistemul EU de numerotare) a fost înlocuit din Ser în Pro. Într-o variantă de realizare, anticorpul sau fragmentul acestuia de

legare a antigenului, conform invenției, cuprinde domeniul constant al lanțului greu IgG4 uman care conține secvența de aminoacizi din SECV ID NR. 55.

În oricare dintre variantele de realizare, menționate mai sus, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform prezentei invenții, poate cuprinde oricare dintre lanțurile variabile ușoare, descrise mai sus, și domeniul constant al lanțului ușor uman. Într-o variantă de realizare, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției, cuprinde domeniul constant al lanțului ușor kappa uman sau o variantă a acestuia, caracterizat prin aceea că varianta cuprinde până la 20 de substituții de aminoacizi modificate. Într-o altă variantă de realizare, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform prezentei invenții, cuprinde domeniul constant al lanțului ușor lambda uman sau o variantă a acestuia, caracterizat prin aceea că varianta cuprinde până la 20 de substituții de aminoacizi modificate. Într-o variantă de realizare, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform prezentei invenții, cuprinde domeniul constant al lanțului ușor kappa uman care conține secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 56.

Într-o variantă de realizare, anticorpul anti-TIGIT, conform prezentei invenții, cuprinde o structură tetramerică completă având două lanțuri ușoare și două lanțuri grele, caracterizat prin aceea că fiecare lanț ușor cuprinde: regiunea variabilă conținând SECV. ID NR. 132 și lanțul ușor kappa uman (SECV. ID NR. 56); iar fiecare lanț greu cuprinde: regiunea variabilă cuprinzând SECV. ID NR. 128, regiunea constantă a IgG1 umană (SECV. ID NR. 86).

Într-o variantă de realizare, anticorpul anti-TIGIT, conform invenției propuse, cuprinde o structură tetramerică completă având două lanțuri ușoare și două lanțuri grele, caracterizat prin aceea că fiecare lanț ușor cuprinde: regiunea variabilă conținând SECV. ID NR. 130 și lanțul ușor kappa uman (SECV. ID NR. 56); iar fiecare lanț greu cuprinde: regiunea variabilă conținând SECV. ID NR. 127, regiunea constantă a IgG1 umană (SECV. ID NR. 86).

Într-o variantă de realizare, anticorpul anti-TIGIT, conform invenției propuse, cuprinde o structură tetramerică completă având două lanțuri ușoare și două lanțuri grele, caracterizat prin aceea că fiecare lanț ușor cuprinde: regiunea variabilă conținând SECV. ID NR. 133 și lanțul ușor kappa uman (SECV. ID NR. 56); iar fiecare lanț greu cuprinde: regiunea variabilă conținând SECV. ID NR. 128, regiunea constantă a IgG1 umană (SECV. ID NR. 86).

În oricare dintre variantele de realizare, menționate mai sus, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției de față, poate fi conjugat cu cel puțin un agent terapeutic. Într-o variantă de realizare, caracterizată prin aceea că agentul terapeutic cuprinde un al doilea anticorp sau un fragment al acestuia, un imunomodulator, un hormon, un agent citotoxic, o enzimă, un radionuclid, cel de-al doilea anticorp este conjugat cu cel puțin un imunomodulator, o enzimă, un marcaj radioactiv, un hormon, o oligonucleotidă antisens sau un agent citotoxic, sau cu o combinație a acestora.

Invenția de față se referă, de asemenea, la polipeptidele izolate care cuprind secvența de aminoacizi din oricare dintre SECV. ID NR. 1-30, 37-52, 57-83 sau 88-151, sau un fragment al oricăreia dintre secvențele menționate.

Prezenta invenție se referă, de asemenea, la acizii nucleici izolați care codifică oricare dintre anticorpilor anti-TIGIT sau dintre fragmentele acestora de legare a antigenului, conform invenției. Într-o variantă de realizare, invenția se referă la acizii nucleici izolați care codifică oricare dintre polipeptidele din SECV. ID NR. 1-30, 37- 52, 57-64 sau 88-133, caracterizate prin aceea că respectivele polipeptide pot cuprinde, în mod opțional, o secvență lider. Invenția se referă, de asemenea, la vectori de expresie cuprinzând un acid nucleic care codifică oricare dintre polipeptidele din SECV. ID NR. 1-30, 37-52, 57-83 sau 88-167 (în care respectivele polipeptide pot cuprinde, în mod opțional, o secvență lider). Acești acizi nucleici izolați și vectori de expresie care îi conțin pot fi folosiți pentru expresia anticorpilor, conform invenției, sau a fragmentelor acestora de legare a antigenului în celulele gazdă recombinante. Astfel, invenția se referă, de asemenea, la celulele gazdă cuprinzând acizii nucleici izolați care codifică oricare dintre polipeptidele din SECV. ID NR. 1-30, 37-52, 57-83 sau 88-151 (în care respectivele polipeptide pot cuprinde, în mod opțional, o secvență lider). Într-o variantă de realizare, celula gazdă prezintă o celulă ovariană de hamster chinezesc. Într-o variantă de realizare, celula gazdă prezintă o celulă de drojdie, de exemplu, o celulă gazdă *Pichia* sau o celulă gazdă *Pichia pastoris*.

Invenția propusă se referă, de asemenea, la compoziții farmaceutice care conțin un anticorp sau un fragment al acestuia de legare a antigenului, conform invenției, și un purtător acceptabil farmaceutic sau un diluant. Într-o variantă de realizare, compoziția conține suplimentar un agent terapeutic. Într-o variantă de realizare, agentul terapeutic suplimentar este

selectat din grupul format din: un anticorp anti-PD1 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-LAG3 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-VISTA sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-BTLA sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-TIM3 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-CTLA4 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-HVEM sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-CD27 sau un fragment al acestuia de legare la antigen, un anticorp anti-CD137 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-OX40 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-CD28 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-PDL1 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-PDL2 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-GITR sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-ICOS sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-SIRP $\alpha$  sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-ILT2 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-ILT3 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-ILT4 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; și un anticorp anti-ILT5 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-4-1BB sau un fragment al acestuia de legare a antigenului. Într-o variantă de realizare, anticorpus anti-PD1 sau fragmentul acestuia de legare a antigenului este selectat din grupul constând din: pembrolizumab sau un fragment al acestuia de legare a antigenului și nivolumab sau un fragment al acestuia de legare a antigenului. Într-o variantă de realizare, anticorpus anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform prezentei invenții, cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 1; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 2; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 3, 79, 80, 81, 82, 83 sau 140; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 4; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 5, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73 sau 141; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 6, 74, 75, 76, 77, 78 sau 142. Într-o variantă de realizare, anticorpus anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 88; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 89, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 134, 135 sau 147; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 90; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 91; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 92, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122 sau 148; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 93. Într-o variantă de realizare, anticorpus anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform prezentei invenții, cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu care include secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 1; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu care include secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 2; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu care include secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 3; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor care conține secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 4; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor care conține secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 5; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor care conține secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 6. Într-o altă variantă de realizare, anticorpus anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform prezentei invenții, cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 57; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 58; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 59; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 60; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 61; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 62. Într-o variantă de realizare, anticorpus anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacid din SECV. ID NR. 88; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 89, 134 sau 135; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de

aminoacizi din SECV. ID NR. 90; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 91; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 92; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 93. Într-o variantă de realizare, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 88; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 134; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 90; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 91; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 92; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 93.

Intr-o variantă de realizare, invenția se referă la o compoziție care cuprinde: (i) un anticorp anti-TIGIT sau un fragment al acestuia de legare a antigenului, conform invenției; și (ii) un anticorp anti-PD1 cuprinzând secvența lanțului greu din SECV. ID NR. 33 și secvența variabilă a lanțului ușor din SECV. ID NR. 34. Într-o altă formă de realizare, invenția se referă la o compoziție care cuprinde: (a) un anticorp anti-TIGIT sau un fragment al acestuia de legare a antigenului, conform invenției; și (b) un anticorp anti-PD1 cuprinzând secvența lanțului greu din SECV. ID NR. 35 și secvența variabilă a lanțului ușor din SECV. ID NR. 36. Într-o variantă de realizare, anticorpul anti-PD1 este administrat înainte de administrarea anticorpului anti-TIGIT. Intr-o variantă de realizare, anticorpul anti-PD1 este administrat cu 4-10 zile înainte de administrarea anticorpului anti-TIGIT. Intr-o variantă de realizare, pre-tratamentul efectuat cu anticorpul anti-PD1 poate modula celulele imune și, ca rezultat, poate îmbunătăți funcția intermediată de Fc a anticorpilor anti-TIGIT. Intr-o variantă, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției, cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 1; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 2; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 3, 79, 80, 81, 82, 83 sau 140; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 4; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 5, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73 sau 141; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 6, 74, 75, 76, 77, 78 sau 142. Intr-o variantă, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 88; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 89, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 134, 135 sau 147; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 90; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 91; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 92, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122 sau 148; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 93. Într-o variantă de realizare, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform prezentei invenții, cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 1; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 2; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 3; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 4; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 5; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 6. Într-o altă variantă de realizare, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform prezentei invenții, cuprinde: (i) regiunea variabilă a lanțului greu CDR1 conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 57; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 58; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 59; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 60; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 61; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 62. Într-o variantă de realizare, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare la antigen,

conform prezentei invenții, cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 88; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 89, 134 sau 135; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID Nr. 90; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 91; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 92; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 93. Intr-o variantă de realizare, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 88; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 134; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 90; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 91; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 92; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 93.

Invenția propusă se referă, de asemenea, la o combinație care conține un anticorp anti-TIGIT sau un fragment al acestuia de legare a antigenului, conform invenției, în combinație cu unul, doi sau mai mulți agenți terapeutici, caracterizat prin aceea că cel de-al doilea agent terapeutic este selectat din grupul format din: un anticorp anti-PD1 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-LAG3 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-VISTA sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-BTLA sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-TIM3 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-CTLA4 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-HVEM sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-CD27 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-CD137 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-OX40 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-CD28 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-PDL1 sau un fragment al acestuia de legare la antigen; un anticorp anti-PDL2 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-GITR sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-ICOS sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-SIRP $\alpha$  sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-ILT2 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-ILT3 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-ILT4 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-ILT5 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; și un anticorp anti-4-1BB sau un fragment al acestuia de legare a antigenului. Intr-o variantă de realizare, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției, cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 1; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 2; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 3, 79, 80, 81, 82, 83 sau 140; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 4; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 5, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73 sau 141; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 6, 74, 75, 76, 77, 78 sau 142. Intr-o variantă de realizare, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 88; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 89, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 134, 135 sau 147; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 90; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 91; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 92, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122 sau 148; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID Nr. 93. Într-o variantă de realizare, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției, cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 1; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 2; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 3; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor

cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 4; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 5; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 6. Într-o altă variantă de realizare, anticorpus anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției, cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 57; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 58; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 59; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 60; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 61; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 62. Într-o variantă de realizare, anticorpus anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 88; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 89, 134 sau 135; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 90; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 91; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 92; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 93. Într-o variantă de realizare, anticorpus anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 88; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 134; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 90; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 91; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 92; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 93.

Invenția de față se referă, de asemenea, la un recipient sau un dispozitiv pentru injecții care cuprinde oricare dintre anticorpii anti-TIGIT sau dintre fragmentele acestora de legare a antigenului, conform prezentei invenții. Într-o variantă de realizare, anticorpus anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției, cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 1; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 2; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 3, 79, 80, 81, 82, 83 sau 140; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 4; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 5, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73 sau 141; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 6, 74, 75, 76, 77, 78 sau 142. Într-o variantă de realizare, anticorpus anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 88; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 89, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 134, 135 sau 147; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 90; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 91; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 92, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122 sau 148; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 93. Într-o variantă de realizare, anticorpus anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului conform invenției cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 1; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 2; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 3; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 4; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 5; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 6. Într-o altă variantă de realizare, anticorpus anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției, cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 57; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând

secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 58; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 59; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 60; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 61; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 62. Intr-o variantă de realizare, anticorpus anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID Nr. 88; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID Nr. 89, 134 sau 135; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 90; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 91; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 92; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 93. Intr-o variantă de realizare, anticorpus anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 88; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 134; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 90; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 91; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 92; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 93.

Invenția solicitată se referă, de asemenea, la un procedeu de obținere a unui anticorpus anti-TIGIT sau a unui fragment de legare a antigenului, conform invenției, care cuprinde: cultivarea unei celule gazdă conținând o polinucleotidă care codifică un lanț greu și/sau un lanț ușor al unui anticorpus în conformitate cu prezenta invenție (sau un fragment al acestuia de legare a antigenului) în condiții favorabile pentru expresia polinucleotidei; și, în mod opțional, recuperarea anticorpusului sau a fragmentului de legare a antigenului din celula gazdă și/sau din mediul de cultură. Într-o variantă de realizare, polinucleotida care codifică lanțul greu și polinucleotida care codifică lanțul ușor se află într-un singur vector. Intr-o altă variantă de realizare, polinucleotida care codifică lanțul greu și polinucleotida care codifică lanțul ușor se află în vectori diferiți. Într-o variantă de realizare, polinucleotida care codifică lanțul greu și polinucleotida care codifică lanțul ușor codifică anticorpusul sau fragmentul de legare a antigenului care cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 1; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 2; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 3, 79, 80, 81, 82, 83 sau 140; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 4; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 5, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73 sau 141; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 6, 74, 75, 76, 77, 78 sau 142. Intr-o altă variantă de realizare, polinucleotida care codifică lanțul greu și polinucleotida care codifică lanțul ușor codifică anticorpusul sau fragmentul de legare a antigenului care cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 88; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 89, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 134, 135 sau 147; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 90; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 91; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 92, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122 sau 148; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 93. Într-o altă variantă de realizare, polinucleotida care codifică lanțul greu și polinucleotida care codifică lanțul ușor codifică anticorpusul sau fragmentul de legare a antigenului cuprinzând: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 1; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 2; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 3; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 4; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 5; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 6. Intr-o altă variantă de realizare,

polinucleotida care codifică lanțul greu și polinucleotida care codifică lanțul ușor codifică anticorpus sau fragmentul de legare a antigenului cuprinzând: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 57; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 58; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 59; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 60; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 61; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 62. Intr-un alt exemplu de realizare, polinucleotida care codifică lanțul greu și polinucleotida care codifică lanțul ușor codifică anticorpus sau fragmentul de legare a antigenului cuprinzând: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 88; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 89, 134 sau 135; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 90; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID Nr. 91; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 92; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 93. Intr-o altă variantă de realizare, polinucleotida care codifică lanțul greu și polinucleotida care codifică lanțul ușor codifică anticorpus sau fragmentul de legare a antigenului cuprinzând: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 88; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 134; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 90; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 91; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 92; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 93. Într-o altă variantă de realizare, polinucleotida care codifică lanțul greu și polinucleotida care codifică lanțul ușor codifică anticorpus sau fragmentul de legare a antigenului cuprinzând: o regiune variabilă a lanțului greu care cuprinde SECV. ID Nr. 128 și o regiune variabilă a lanțului ușor care cuprinde SECV. ID Nr. 132. Intr-o altă variantă de realizare, polinucleotida care codifică lanțul greu și polinucleotida care codifică lanțul ușor codifică un anticorp sau un fragment de legare la antigen cuprinzând: regiunea variabilă a lanțului greu care cuprinde SECV. ID NR. 127 și regiunea variabilă a lanțului ușor care cuprinde SECV. ID NR. 130. Într-o altă variantă de realizare, polinucleotida care codifică lanțul greu și polinucleotida care codifică lanțul ușor codifică anticorpus sau fragmentul de legare a antigenului cuprinzând: regiunea variabilă a lanțului greu care cuprinde SECV. ID NR. 128 și regiunea variabilă a lanțului ușor care cuprinde SECV. ID NR. 133.

Invenția de față se referă, de asemenea, la un procedeu de tratare a cancerului la un subiect, care necesită aceasta, cuprinzând administrarea la subiectul în cauză a unei cantități eficiente dintr-un anticorp anti-TIGIT sau dintr-un fragment de legare a antigenului, conform invenției, în mod opțional în asociere cu un agent terapeutic suplimentar sau cu o procedură terapeutică. Într-o variantă de realizare, subiectul supus tratamentului este un subiect uman. Intr-o variantă, agentul terapeutic suplimentar a fost selectat din grupul constând din: un anticorp anti-PD1 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-LAG3 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-VISTA sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-BTLA sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-TIM3 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-CTLA4 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-HVEM sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-CD27 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-CD137 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-CD28 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-PDL1 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-PDL2 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-GITR sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-ICOS sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-SIRPα sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-ILT2 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-ILT3 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-ILT4 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-ILT5 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului;

antigenului; și un anticorp anti-4-1BB sau un fragment al acestuia de legare a antigenului. Într-o variantă de realizare, anticorpul anti-PD1 sau fragmentul acestuia de legare a antigenului a fost selectat din grupul conținând: pembrolizumab sau un fragment al acestuia de legare a antigenului și nivolumab sau un fragment al acestuia de legare a antigenului. Într-o variantă de realizare, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției, cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 1; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 2; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 3, 79, 80, 81, 82, 83 sau 140; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 4; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 5, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73 sau 141; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 6, 74, 75, 76, 77, 78 sau 142. Într-o variantă de realizare, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 88; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 89, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 134, 135 sau 147; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 90; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 91; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 92, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122 sau 148; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID Nr. 93. Într-o variantă de realizare, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției, cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 1; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 2; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 3; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 4; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 5; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 6. Într-o altă variantă de realizare, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției, cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 57; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 58; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 59; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 60; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 61; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 62. Într-o variantă de realizare, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 88; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 89, 134 sau 135; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 90; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 91; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 92; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 93. Într-o variantă de realizare, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 88; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 134; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 90; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 91; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 92; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 93.

Invenția de față se referă, de asemenea, la un procedeu de tratare a cancerului la un subiect, care necesită aceasta, cuprinzând administrarea subiectului în cauză a unei cantități eficiente dintr-un anticorp anti-TIGIT sau dintr-un fragment de legare a antigenului, conform invenției și administrarea suplimentară a unui anticorp anti-PD1 sau a unui fragment al acestuia

de legare la antigen. Intr-o variantă de realizare, anticorpul anti-PD1 sau fragmentul acestuia de legare la antigen este selectat din grupul constând din: pembrolizumab sau un fragment al acestuia de legare la antigen și nivolumab sau un fragment al acestuia de legare la antigen. Intr-o variantă de realizare, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare la antigen conform prezentei invenții cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 1; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 2; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 3, 79, 80, 81, 82, 83 sau 140; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 4; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 5, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73 sau 141; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 6, 74, 75, 76, 77, 78 sau 142. Într-o variantă de realizare, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 88; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 89, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 134, 135 sau 147; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 90; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 91; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 92, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122 sau 148; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID Nr. 93. Intr-o variantă de realizare, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției, cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 1; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 2; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 3; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 4; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 5; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 6. Intr-o altă variantă de realizare, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției, cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 57; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 58; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 59; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 60; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 61; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 62. Intr-o variantă de realizare, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 88; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 89, 134 sau 135; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 90; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 91; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 92; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 93. Intr-o variantă de realizare, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 88; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 134; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 90; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 91; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 92; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 93.

Invenția de față se referă, de asemenea, la un procedeu de tratare a unei infecții sau a unei boli infecțioase la un subiect cuprinzând administrarea subiectului în cauză a unei cantități eficiente dintr-un anticorp sau dintr-un fragment de legare a antigenului, conform invenției, în mod opțional, în asociere cu un agent terapeutic suplimentar sau cu o procedură terapeutică. Într-o variantă de realizare, subiectul supus tratamentului este un subiect uman. Intr-o variantă de

realizare, agentul terapeutic suplimentar este selectat din grupul format din: un anticorp anti-PD1 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-LAG3 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-VISTA sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-BTLA sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-TIM3 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-CTLA4 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-HVEM sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-CD27 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-CD137 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-  
5 OX40 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-CD28 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-PDL1 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-PDL2 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-GITR sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-ICOS sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-SIRP $\alpha$  sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-ILT2 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-ILT3 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-ILT4 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; un anticorp anti-ILT5 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului; și un anticorp anti-4-1BB sau un fragment al acestuia de legare a antigenului. Într-o variantă de  
20 realizare, anticorpul anti-PD1 sau un fragment al acestuia de legare la antigen a fost selectat din grupul constând din: pembrolizumab sau un fragment al acestuia de legare a antigenului și nivolumab sau un fragment al acestuia de legare a antigenului. Într-o variantă de realizare, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform prezentei invenții, cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 1; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 2; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu conținând  
25 secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 3, 79, 80, 81, 82, 83 sau 140; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 4; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 5, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73 sau 141; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 6, 74, 75, 76, 77, 78 sau 142. Într-o variantă de realizare, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 88; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 89, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 134, 135 sau 147; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 90; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 91; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 92, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122 sau 148; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID Nr. 93. Într-o variantă de realizare, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției, cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 1; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 2; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 3; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 4; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 5; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 6. Într-o altă variantă de realizare, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției, cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând  
35 secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 57; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 58; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 59; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 60; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 61; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 62. Într-o variantă de realizare, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 88; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 89, 134 sau 135; (iii) CDR3 a regiunii variabile a

lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 90; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 91; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 92; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 93. Intr-o variantă de realizare, anticorpus anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 88; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 134; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 90; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 91; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 92; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 93.

Prezenta invenție se referă, de asemenea, la un vaccin care cuprinde un anticorpus sau un fragment al acestuia de legare a antigenului, conform invenției. Într-o variantă de realizare, anticorpus anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform prezentei invenții, cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 1; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 2; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 3, 79, 80, 81, 82, 83 sau 140; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 4; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 5, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73 sau 141; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 6, 74, 75, 76, 77, 78 sau 142. Într-o variantă de realizare, anticorpus anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 88; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 89, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 134, 135 sau 147; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 90; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 91; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 92, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122 sau 148; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID Nr. 93. Intr-o variantă de realizare, anticorpus anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției, cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 1; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 2; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 3; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 4; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 5; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 6. Intr-o altă variantă de realizare, anticorpus anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției, cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 57; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 58; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 59; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 60; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 61; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 62. Intr-o variantă de realizare, anticorpus anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 88; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 89, 134 sau 135; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 90; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 91; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 92; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 93. Intr-o variantă de realizare, anticorpus anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 88; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând

secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 134; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 90; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 91; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 92; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 93. Intr-o variantă de realizare, vaccinul cuprinde suplimentar un antigen.

Invenția de față se referă, de asemenea, la un procedeu de detectare a prezenței unei peptide TIGIT sau a unui fragment al acesteia într-o probă care cuprinde contactarea probei în cauză cu un anticorp sau cu un fragment al acestuia de legare a antigenului, conform prezentei invenții, și de detectare a prezenței unui complex între anticorp sau fragment și peptidă, caracterizat prin aceea că detectarea complexului indică prezența peptidei TIGIT. Într-o variantă de realizare, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul de legare a antigenului, conform prezentei invenții, cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 1; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 2; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 3, 79, 80, 81, 82, 83 sau 140; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 4; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 5, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73 sau 141; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 6, 74, 75, 76, 77, 78 sau 142. Într-o variantă de realizare, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 88; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 89, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 134, 135 sau 147; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 153; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 91; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 92, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122 sau 148; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 93. Intr-o variantă de realizare, anticorpul sau fragmentul de legare a antigenului, conform invenției, cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 1; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 2; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 3; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 4; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 5; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 6. Într-o altă variantă de realizare, anticorpul sau fragmentul de legare a antigenului, conform invenției, cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 57; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 58; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 59; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 60; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 61; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 62. Într-o variantă de realizare, anticorpul sau fragmentul de legare a antigenului cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 88; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 89, 134 sau 135; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 90; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 91; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 92; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 93. Într-o variantă de realizare, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 88; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 134; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 90; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 91; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din

SECV. ID NR. 92; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 93.

Prezenta invenție se referă, de asemenea, la un procedeu de sporire a activității unei celule imune cuprinzând aducerea în contact a celulei imune cu oricare dintre anticorpii sau fragmentele de legare a antigenului, conform invenției. Într-o variantă de realizare, invenția se referă la o metodă de sporire a activității unei celule imune, caracterizată prin aceea că cuprinde administrarea la un subiect, care necesită aceasta, a unei cantități eficiente dintr-un anticorp sau dintr-un fragment de legare a antigenului, conform invenției. Într-o variantă de realizare, procedeul este utilizat pentru: tratamentul tumorii maligne, tratamentul unei infecții sau al unei boli infecțioase, sau în calitate de adjuvant pentru vaccin. Într-o variantă de realizare, sporirea activității unei celule imune poate fi detectată prin măsurarea proliferării acestei celule imune. De exemplu, creșterea activității unei celule T poate fi detectată prin măsurarea proliferării celulei T. Într-o variantă de realizare, creșterea activității unei celule imune poate fi detectată prin măsurarea activării celulelor T *ex vivo* într-o probă provenită de la subiectul în cauză. Într-o variantă de realizare, creșterea activității celulelor T este determinată prin: (i) măsurarea reacțiilor limfocitare mixte sau stimularea mAb anti-CD3 directă a receptorului celulelor T (TCR) de semnalizare pentru a induce producerea unei citokine, selectate din grupul constând din: IL-2, TNF $\alpha$ , IL-17, IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , GM-CSF, RANTES, IL-6, IL-8, IL-5 și IL-13; (ii) măsurarea producției induse de către SEB a uneia sau a mai multor citokine, selectate din grupul constând din: IL-2, TNF $\alpha$ , IL-17, IFN $\gamma$ , GM-CSF, RANTES, IL-6, IL-8, IL-5 și IL-13; sau (iii) măsurarea producției induse de către TT a unei citokine, selectate din grupul format din: IL-2, TNF $\alpha$ , IL-17, IFN $\gamma$ , GM-CSF, RANTES, IL-6, IL-8, IL-5 și IL-13. Într-o variantă de realizare, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform prezentei invenții, cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 1; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 2; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 3, 79, 80, 81, 82, 83 sau 140; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 4; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 5, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73 sau 141; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 6, 74, 75, 76, 77, 78 sau 142. Într-o variantă de realizare, anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 88; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 89, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 134, 135 sau 147; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 90; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 91; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 92, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122 sau 148; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 93. Într-o variantă de realizare, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul de legare a antigenului, conform invenției, cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 1; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 2; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 3; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 4; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 5; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 6. Într-o altă variantă de realizare, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul de legare a antigenului, conform invenției, cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 57; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 58; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 59; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 60; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 61; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 62. Într-o variantă de realizare, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 88; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de

aminoacizi din SECV. ID NR. 89, 134 sau 135; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 90; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 91; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 92; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 93. Intr-o variantă de realizare, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 88; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 134; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 90; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 91; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 92; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 93.

Invenția propusă se referă, de asemenea, la un procedeu de tratare a cancerului sau a unei boli infecțioase la un subiect cuprinzând administrarea subiectului în cauză a unei cantități eficiente dintr-un anticorp antagonist anti-TIGIT și dintr-un anticorp antagonist anti-PD1, caracterizat prin aceea că anticorpul anti-TIGIT posedă o funcție efectoare sporită în comparație cu un anticorp parental. Termenul „anticorp parental”, așa cum este utilizat în prezenta invenție, se referă la anticorpii având o regiune Fc de tip sălbatic și/sau o glicozilare de tip sălbatic (și anume, paternul de glicozilare care rezultă din expresia polipeptidei într-o celulă gazdă nemodificată de mamifer). Funcția efectoare a unui anticorp parental poate fi sporită prin intermediul mutagenzei regiunii sale Fc sau prin modificarea glicozilării acestuia (așa cum se discută în detaliu în continuare). Într-o variantă de realizare, anticorpul anti-PD1 este administrat înainte de administrarea unui anticorp parental. Într-o variantă de realizare, anticorpul anti-PD1 este administrat cu 4-10 zile înainte de administrarea anticorpului anti-TIGIT. Într-o variantă de realizare, pre-tratamentul cu anticorp anti-PD1 poate modula celulele imune, astfel încât rezultă o funcție Fc intermediată sporită a anticorpilor anti-TIGIT. Într-o variantă de realizare, anticorpul anti-TIGIT cuprinde un domeniu constant de IgG1 umană. Într-o variantă de realizare, tratamentul cu anti-TIGIT și anticorp anti-PD1 nu conduce la epuizarea Treg. Într-o variantă de realizare, anticorpul anti-PD1 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului este selectat din grupul constând din: pembrolizumab și nivolumab. Într-o variantă de realizare, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul de legare a antigenului, conform invenției solicitate, cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 1; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 2; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 3; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 4; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 5; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 6. Într-o variantă de realizare, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul de legare a antigenului cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 88; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 89, 134 sau 135; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 90; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 91; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 92; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 93. Intr-o variantă de realizare, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 88; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 134; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 90; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 91; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 92; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 93.

Invenția solicitată se referă, de asemenea, la un procedeu de tratare a cancerului sau a unei boli infecțioase la un subiect, care cuprinde administrarea la subiectul respectiv a unei cantități eficiente dintr-un anticorp antagonist anti-TIGIT și un anticorp antagonist anti-PD1, caracterizat prin aceea că anticorpul anti-TIGIT este afucozilat. Într-o variantă de realizare, anticorpului anti-

- TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției, cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 1; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 2; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 3; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 4; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 5; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 6. Într-o variantă de realizare, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul de legare a antigenului, conform invenției, cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 88; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 89, 134 sau 135; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 90; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 91; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 92; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 93. Într-o variantă de realizare, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului cuprinde: (i) CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 88; (ii) CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 134; (iii) CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 90; (iv) CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 91; (v) CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 92; și (vi) CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 93.
- Invenția în cauză se referă, de asemenea, la un procedeu de sporire a activității antitumorale a anticorpului anti-TIGIT cuprinzând: obținerea unui anticorp anti-TIGIT parental și sporirea funcției efectoare a anticorpului anti-TIGIT, caracterizat prin aceea că activitatea anticorpului anti-TIGIT rezultat este sporită în comparație cu cea a anticorpului anti-TIGIT parental. Așa cum este utilizat în prezenta invenție, termenul „anticorp parental” se referă la anticorpii posedând o regiune Fc de tip sălbatic și/sau o glicozilare de tip sălbatic (de exemplu, modelul de glicozilare care rezultă din exprimarea polipeptidei într-o celulă gazdă nemodificată de mamifer). Funcția efectoare a unui anticorp parental poate fi crescută prin mutageneza regiunii sale Fc sau prin modificarea glicozilării sale, de exemplu, prin generarea anticorpului afucozilat (așa cum s-a discutat în detaliu în continuare). Într-o variantă de realizare, funcția efectoare a unui anticorp anti-TIGIT parental este sporită prin mutageneză în regiunea Fc a anticorpului anti-TIGIT parental. Într-o altă formă de realizare, funcția efectoare a unui anticorp anti-TIGIT parental este sporită prin eliminarea resturilor de fucoză din anticorp sau prin exprimarea anticorpului într-o celulă gazdă, modificată genetic pentru a elimina activitatea enzimei care adaugă fucoză în glicoproteine.
- Invenția se explică prin desenele din fig. 1 - fig. 17, care reprezintă:
- fig. 1, legarea anticorpului 14A6 la TIGIT uman și rhesus (exprimate în celulele CHO-K1).
  - fig. 2, legarea anticorpului 28H5 la TIGIT uman și rhesus (exprimate în celulele CHO-K1).
  - fig. 3, blocarea de către anticorpii 14A6 și 28H5 a interacțiunii hCD155 cu hTIGIT, determinată prin intermediul testului de blocare ELISA pe bază de celule.
  - fig. 4, legarea anticorpului 31C6 la TIGIT uman și rhesus (exprimate în celulele CHO-K1) și, de asemenea, se arată că anticorpul 31C6 blochează interacțiunea hCD155 cu hTIGIT.
  - fig. 5, activitatea anticorpilor 14A6 și 28H5 într-un test de celule T *in vitro*.
  - fig. 6, activitatea anticorpilor 14A6 și 31C6 într-un test de celule T *in vitro*.
  - fig. 7, expresia TIGIT, CD226, CD155 și CD96 în liniile de celule T umane primare. În ziua a 3-a, clona BC4-49 demonstrează cea mai înaltă reglare a TIGIT (negativă) și reglarea descendentă a CD226 (pozitivă).
  - fig. 8A și 8B, activitatea diversilor anticorpi anti-TIGIT într-un test de celule T *in vitro*.
- Aceasta arată că MBS43 și anticorpii anti-TIGIT, 14A6, 37D10 și 28H5 regenerează răspunsurile IFN $\gamma$  în celulele T umane primare.
- fig. 9A-9D, efectul administrării concomitente a unui anticorp de șobolan anti-TIGIT murin (GIGD7) și a unui anticorp anti-PD-1 murin la răspunsul antitumoral al șoarecilor implantați cu linia celulară CT26 (n = 10/grup), în comparație cu grupele în care s-a efectuat

tratamentul monoterapeutic. Tratamentul a început atunci când tumorile au atins 75 mm<sup>3</sup> - 115 mm<sup>3</sup>.

fig. 10, efectul izotipului Fc asupra activității antitumorale a anticorpului anti-TIGIT (18G10) în combinație cu anticorpur anti-PD-1 într-un model tumoral animal.

5 fig. 11A-11C, efectul izotipului Fc asupra activității antitumorale a anticorpului anti-TIGIT (18G10) în combinație cu anticorpur anti-PD-1 într-un model tumoral animal.

fig. 12, efectul izotipului Fc asupra activității antitumorale a anticorpului anti-TIGIT (11A11) în combinație cu anticorpur anti-DP-1 într-un model tumoral animal.

10 fig. 13A-13C, efectul izotipului Fc asupra activității antitumorale a anticorpului anti-TIGIT (11A11) în combinație cu anticorpur anti-PD-1 într-un model tumoral animal.

fig. 14, harta termică indicând regiunile TIGIT umane care sunt puternic sau slab protejate de deuterare prin legarea anticorpului 14A6. Secvența de aminoacizi, prezentată pe harta termică, corespunde SECV. ID NR. 87.

15 fig. 15, harta termică indicând regiunile TIGIT umane care sunt puternic sau slab protejate de deuterare prin legarea anticorpului 31C6. Secvența de aminoacizi, prezentată pe harta termică, corespunde SECV. ID NR. 87.

fig. 16, efectul unor diverse clone ale 31C6 umanizate, în comparație cu anticorpii parentali și himerici, într-un test funcțional de celule T modificate.

20 fig. 17, efectul unor diverse clone ale 31C6 umanizate, în comparație cu anticorpii himerici, într-un test funcțional de celule T primare.

#### Abrevieri

Pe tot parcursul descrierii detaliate și exemplelor de realizare a prezentei invenții vor fi folosite următoarele abrevieri:

25 ADCC - Citotoxicitate celulară dependentă de anticorpi

CDC - Citotoxicitate dependentă de complement

CDR - Regiune de determinare a complementarității în regiunile variabile ale imunoglobulinei, definită prin intermediul sistemului de numerotare Kabat

CHO - Celule ovariene de hamster chinezesc

30 ELISA - Test de imunoabsorbție a enzimelor lincate

FR - Regiune cadru de anticorpi: regiunile variabile ale imunoglobulinei, cu excepția regiunilor CDR

HRP - Peroxidază de hrean

IFN - Interferon

35 IC50 - Concentrație având ca rezultat o inhibare de 50%

IgG - Imunoglobulina G

Kabat - Sistem de ajustare și numerotare a imunoglobulinelor, elaborat pentru prima dată de către Elvin A. Kabat ((1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Health Service 5th Ed. Public, National Institutes of Health, Bethesda, Md.)

40 mAb sau Mab, sau MAb - Anticorp monoclonal

SEB - Enterotoxina stafilococică B

TT - Toxoid tetanic

V region - Segmentul lanțurilor IgG care este variabil în secvență între diferiți anticorpi. Acesta se extinde până la restul 109 după Kabat în lanțul ușor și 113 în lanțul greu

45 VH - Regiunea variabilă a lanțului greu al imunoglobulinei

VK - Regiunea variabilă a lanțului ușor al imunoglobulinei kappa

#### Definiții

50 Ca invenția solicitată să poată fi înțeleasă mai ușor, anumiți termeni tehnici și științifici sunt definiți în mod concret în continuare. Dacă nu sunt definiți în mod concret în altă parte în prezentul document, toți ceilalți termeni tehnici și științifici utilizați aici poartă semnificația înțeleasă în mod obișnuit de către un specialist în domeniul de care ține această invenție.

Așa cum este utilizat în descrierea de față, inclusiv în revendicările anexate, formele singulare ale cuvintelor, cum ar fi „a”, „an” și articolul hotărât „the”, includ referințele lor de plural corespunzătoare dacă contextul nu dictează în mod clar contrariul.

55 Cuvintele „administrare” și „tratament”, așa cum se aplică acestea unui animal, om, subiect experimental, celule, țesut, organ sau fluid biologic, se referă la contactarea unui produs farmaceutic, terapeutic, de diagnostic exogen, sau a unei compoziții, cu un animal, om, subiect, celulă, țesut, organ sau fluid biologic. Tratarea unei celule cuprinde contactarea unui reactiv cu

celula, precum și contactarea unui reactiv cu un fluid, unde fluidul este în contact cu celula. Cuvintele „administrare” și „tratament” se referă, de asemenea, la tratamentele *in vitro* și *ex vivo*, de exemplu, ale unei celule, cu ajutorul unui reactiv, unui produs diagnostic, unui compus de legare sau unei altor celule.

- 5 Cuvintele „a trata” sau „tratare” semnifică administrarea unui agent terapeutic, cum ar fi o compoziție care conține oricare dintre anticorpii sau fragmentele de legare a antigenului, conform prezentei invenții, pe cale internă sau externă, la un subiect sau un pacient care are unul sau mai multe simptome de boală sau care este suspectat de a avea o boală, împotriva căreia agentul comportă activitate terapeutică. De regulă, agentul este administrat într-o cantitate
- 10 eficientă pentru a ameliora unul sau mai multe simptome de boală la subiectul tratat sau la populație, fie prin inducerea regresiei, fie prin inhibarea progresiei unui astfel de simptom(e) până la orice grad măsurabil clinic. Cantitatea dintr-un agent terapeutic care este eficientă pentru a atenua orice simptom al unei anumite boli poate varia în funcție de factori, cum ar fi starea bolii, vârsta și greutatea pacientului, precum și capacitatea preparatului de a genera răspunsul dorit la subiectul în cauză. Faptul dacă un simptom al maladiei a fost atenuat poate fi evaluat prin
- 15 orice măsurare clinică, utilizată în mod obișnuit de către terapeuți sau de către alți lucrători medicali calificați pentru evaluarea severității sau stării de progresie a acestui simptom.

#### TIGIT

- 20 Termenul TIGIT include TIGIT uman, TIGIT maimuță-cynomolgus și TIGIT maimuță-rhesus, precum și fragmentele acestora, cum ar fi fragmentele lor mature, lipsite de peptida de semnal. Într-o variantă de realizare a invenției, secvența de aminoacizi a TIGIT uman cuprinde secvența de aminoacizi, descrisă în resturile de aminoacizi 25-244 din GenBank Accession Number\_ NP 776160.2 (SECV. ID NR. 31). (Resturile de aminoacizi 1-24 din SECV. ID NR. 31 corespunde unei peptide lider).

- 25 Într-o variantă de realizare a invenției, secvența de aminoacizi a TIGIT de maimuță cynomolgus, de exemplu, *Macaca fascicularis*, cuprinde secvența de aminoacizi descrisă în (SECV. ID NR. 32); a se vedea, de asemenea, Genbank Accession nr. XP\_005548157. Secvența de aminoacizi a TIGIT maimuță-rhesus este identică cu secvența de aminoacizi a TIGIT maimuță-cynomolgus. (Resturile de aminoacizi 1-24 din SECV. ID NR. 32 corespunde unei peptide lider).
- 30

#### Anticorpii anti-TIGIT și fragmentele acestora de legare la antigen

- Prezenta invenție se referă la anticorpii sau la fragmentele acestora de legare a antigenului care se leagă la TIGIT uman și la modurile de utilizare a unor astfel de anticorpi sau fragmente.
- 35 În unele variante de realizare, anticorpii anti-TIGIT sunt izolați.

- Așa cum este utilizat în documentul de față, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului se referă la un anticorp sau la un fragment al acestuia de legare a antigenului care se leagă în mod specific la TIGIT uman. Anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului care „se leagă în mod specific la TIGIT uman” este un anticorp sau un
- 40 fragment al acestuia de legare a antigenului care se leagă la TIGIT uman cu o valoare a  $K_D$  de aproximativ 1 nM sau cu o afinitate mai mare (de exemplu, 1 nM-2pM, 1 nM, 100 pM, 10 pM sau 2pM), însă nu se leagă la alte proteine lipsite de această secvență. De exemplu, un anticorp care „se leagă specific” la TIGIT uman nu se leagă la CD226 uman, CD155 uman și CD112 uman. În calitate de alt exemplu, un anticorp sau un fragment de legare a antigenului, care se
- 45 leagă în mod specific la TIGIT uman, se poate lega la o formă FLAG®-marcată de TIGIT uman, dar nu se pot lega la alte proteine FLAG®-marcate care sunt lipsite de epitopii TIGIT uman. Într-o variantă de realizare, anticorpul, conform prezentei invenții, care se leagă în mod specific la TIGIT uman posedă, de asemenea, o reactivitate încrucișată în raport cu TIGIT cynomolgus și rhesus. Așa cum este utilizat în documentul de față, termenul „capacitatea de reactivitate
- 50 încrucișată” se referă la capacitatea unui anticorp de a reacționa cu o proteina omoloagă de la alte specii. Faptul dacă un anticorp se leagă în mod specific la TIGIT uman poate fi determinat folosind orice teste cunoscute în domeniul de referință. Exemplele de teste, cunoscute în domeniu, pentru determinarea afinității de legare includ rezonanța plasmonică de suprafață (de exemplu, BIACORE) sau o tehnică similară (de exemplu, KinExA sau OCTET).

- 55 Prezenta invenție se referă la anticorpii anti-TIGIT și la procedeele de aplicare a acestora. Așa cum este utilizat în documentul de față, termenul „anticorp” se referă la orice formă de anticorp care manifestă activitatea biologică dorită. Astfel, acesta este folosit în sensul cel mai larg și acoperă în mod specific, dar nu se limitează la aceasta, anticorpii monoclonali (incluzând anticorpii monoclonali de lungime deplină care conțin două lanțuri ușoare și două lanțuri grele),

anticorpilor policlonali, anticorpilor multispecifici (de exemplu, anticorpilor bispecifici), anticorpilor umanizați, anticorpilor total umani, anticorpilor himerici și anticorpilor de cămilă cu un singur domeniu.

5 Prezentă invenție se referă la anticorpilor anti-TIGIT parentali neumani (de exemplu, de șoarece și de rozătoare) și la fragmentele lor de legare a antigenului și la procedeele de utilizare a acestora. Acești anticorpi pot fi modificați pentru utilizarea preconizată, cum ar fi umanizarea unui anticorp pentru utilizarea sa în calitate de anticorp terapeutic sau de fragment uman.

10 Prezentă invenție se referă la fragmentele anti-TIGIT de legare a antigenului și la procedeele de utilizare a acestora. Așa cum este utilizat în prezentul document, și dacă nu se indică altfel, termenul „fragment de anticorp” sau „fragment de legare a antigenului” se referă la fragmentele de legare a antigenului ale anticorpilor, și anume, la fragmentele de anticorpi care păstrează capacitatea de a se lega specific la antigenul legat de un anticorp cu lungime deplină, de exemplu, la fragmentele care păstrează una sau mai multe regiuni CDR. Exemplele de fragmente de legare a antigenului includ, dar nu se limitează la acestea, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> și 15 fragmentele Fv; diacorpilor; anticorpilor liniari; moleculele de anticorp cu un singur lanț, de exemplu, sc-Fv; nano-anticorpilor și anticorpilor multispecifici, formați din fragmente de anticorpi.

Prezentă invenție se referă la fragmentele Fab anti-TIGIT și la procedeele de utilizare a acestora. Un „fragment Fab” este format dintr-un lanț ușor și bucla C<sub>H1</sub>, și regiunile variabile ale unui lanț greu. Lanțul greu al unei molecule Fab nu poate forma o legătură disulfurică cu o altă 20 moleculă de lanț greu. Un „fragment Fab” poate constitui produsul clivajului cu papaină al unui anticorp.

Prezentă invenție se referă la anticorpilor anti-IGIT și fragmentele acestora de legare a antigenului, care cuprind o regiune Fc, și la procedeele de utilizare a acestora. Regiunea „Fc” conține două fragmente de lanț greu cuprinzând domeniile C<sub>H1</sub> și C<sub>H2</sub> ale unui anticorp. Cele 25 două fragmente de lanț greu se mențin împreună prin intermediul a două sau mai multe legături disulfidice și prin interacțiunile hidrofobe ale domeniilor C<sub>H3</sub>.

Prezentă invenție se referă la fragmentele Fab' anti-TIGIT și la procedeele de utilizare a acestora. Un „fragment Fab'” conține un lanț ușor și o porțiune sau un fragment dintr-un lanț 30 greu cuprinzând domeniul V<sub>H</sub> și domeniul C<sub>H1</sub>, precum și regiunea dintre domeniile C<sub>H1</sub> și C<sub>H2</sub>, astfel încât legătura disulfidică intercatenare se poate forma între cele două lanțuri grele a două fragmente Fab' pentru a forma molecula F(ab')<sub>2</sub>.

Prezentă invenție se referă la fragmentele F(ab')<sub>2</sub> anti-TIGIT și la procedeele de utilizare a acestora. Un „fragment F(ab')<sub>2</sub>” conține două lanțuri ușoare și două lanțuri grele conținând o 35 porțiune a regiunii constante dintre domeniile C<sub>H1</sub> și C<sub>H2</sub>, astfel încât legătura disulfidică intercatenare se formează între cele două lanțuri grele. Prin urmare, fragmentul F(ab')<sub>2</sub> este compus din două fragmente Fab' care sunt ținute împreună printr-o legătură disulfidică dintre cele două lanțuri grele. Un „fragment F(ab')<sub>2</sub>” poate fi produsul clivajului cu pepsină al unui anticorp.

Prezentă invenție se referă la fragmentele anticorpilor anti-TIGIT Fv și la procedeele de 40 utilizare a acestora. „Regiunea Fv” cuprinde regiunile variabile atât din lanțurile grele cât și din lanțurile ușoare, însă este lipsită de regiunile constante.

Prezentă invenție se referă la fragmentele scFv anti-TIGIT și la procedeele de utilizare a acestora. Termenul „Fv monocatenar” sau anticorp „scFv” se referă la fragmentele anticorpului cuprinzând domeniile V<sub>H</sub> și V<sub>L</sub> ale unui anticorp, în care aceste domenii sunt prezente într-un 45 singur lanț polipeptidic. În general, polipeptida Fv cuprinde suplimentar un linker polipeptidic între domeniile V<sub>H</sub> și V<sub>L</sub> care îi permite scFv să formeze structura dorită pentru legarea antigenului [1] (WO 88/01649, US 4.946.778; US 5.260.203).

Prezentă invenție se referă la anticorpilor anti-TIGIT de domeniu și la procedeele de 50 utilizare a acestora. Un „anticorp de domeniu” este un fragment imunologic funcțional al unei imunoglobuline conținând doar regiunea variabilă a unui lanț greu sau regiunea variabilă a unui lanț ușor. În anumite cazuri, două sau mai multe regiuni V<sub>H</sub> sunt unite în mod covalent prin intermediul unui linker peptidic pentru a crea un anticorp de domeniu bivalent. Cele două regiuni V<sub>H</sub> ale unui anticorp de domeniu bivalent pot fi direcționate spre antigene identice sau diferite.

Prezentă invenție se referă la anticorpilor bivalenți anti-TIGIT și la procedeele de utilizare a 55 acestora. Un „anticorp bivalent” cuprinde două situsuri de legare a antigenului. În anumite cazuri, cele două situsuri de legare au aceleași specificități antigenice. Cu toate acestea, anticorpilor bivalenți pot fi bispecifici (de văzut în continuare).

Prezentă invenție se referă la anticorpilor anti-TIGIT cu un singur domeniu camelized (de cămilă) și la procedeele de utilizare a acestora. În anumite variante de realizare, anticorpilor includ,

de asemenea, anticorpii cu un singur domeniu camelizat [2] (Reichmann et al. *J. Immunol. Methods*, no 231, 1999, p.25; WO 94/04678; WO 94/25591; US 6.005.079). Într-o variantă de realizare, prezenta invenție se referă la anticorpii cu un singur domeniu cuprinzând două domenii  $V_H$  cu astfel de modificări, încât se formează anticorpi cu un singur domeniu.

5       Prezenta invenție se referă la diacorpul anti-TIGIT și la procedeele de utilizare a acestora. Așa cum este utilizat în prezenta descriere, termenul „diacorp” desemnează fragmentele mici de anticorp cu două situsuri de legare a antigenului, caracterizat prin aceea că fragmentele cuprind un domeniu variabil de lanț greu ( $V_H$ ), conectat la un domeniu variabil de lanț ușor ( $V_L$ ) în unul și același lanț polipeptidic ( $V_H-V_L$  sau  $V_L-V_H$ ). Prin folosirea unui linker care este prea scurt  
10       pentru a permite împerecherea celor două domenii pe unul și același lanț, domeniile sunt forțate să se împerecheze cu domeniile complementare ale unui alt lanț și să formeze două situsuri de legare a antigenului. Diacorpul sunt descriși mai detaliat în literatura de specialitate [3] (WO 93/11161; Holliger et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1993, p. 6444-6448; Holliger and Hudson. *Nat. Biotechnol.*, no 23, 2005, p. 1126-1136).

15       De regulă, anticorpul sau fragmentul de legare a antigenului, conform invenției, care este modificat într-un fel sau altul pot păstra cel puțin 10% din activitatea sa (în comparație cu anticorpul parental), atunci când această activitate este exprimată pe bază molară. De preferință, anticorpul sau fragmentul de legare a antigenului, conform invenției, păstrează cel puțin 20%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% sau 100%, sau mai mult din afinitatea de legare a TIGIT de către  
20       anticorpul parental. De asemenea, este prevăzut că un anticorp sau un fragment de legare a antigenului conform prezentei invenții poate include substituții de aminoacizi conservative sau non-conservative (denumite în continuare „variante conservative” sau „variante funcționale de conservare” ale anticorpului), care nu afectează în mod substanțial activitatea sa biologică.

Prezenta invenție se referă la anticorpii anti-TIGIT izolați și la fragmentele acestora de legare a antigenului, și la procedeele de utilizare a acestora. Anticorpii „izolați” sau fragmentele acestora de legare a antigenului sunt, cel puțin parțial, liberi de alte molecule biologice din celulele sau culturile celulare în care sunt produse aceștia. Astfel de molecule biologice includ  
25       acizi nucleici, proteine, lipide, carbohidrați sau alte materiale, cum ar fi reziduurile celulare și mediul de creștere. Totodată, un anticorp izolat sau un fragment de legare a antigenului pot fi, cel puțin parțial, liberi de componentele sistemului de expresie, cum ar fi moleculele biologice dintr-o celulă gazdă sau din mediul de creștere a acestora. În general, termenul „izolat” nu este menit să desemneze absența completă a unor astfel de molecule biologice sau absența apei, soluțiilor tampon sau sărurilor, sau componentelor unui produs farmaceutic care cuprinde acești anticorpi sau aceste fragmente.

35       Prezenta invenție se referă la anticorpii monoclonali anti-TIGIT și fragmentele acestora de legare a antigenului, precum și la compozițiile monoclonale cuprinzând o multitudine de anticorpi monoclonali izolați. Termenul „anticorp monoclonal”, așa cum este utilizat în invenția solicitată, se referă la o populație de anticorpi în mod esențial omogenă, și anume, moleculele anticorpilor cuprinși în populație sunt identici după secvența de aminoacizi, cu excepția unor  
40       posibile mutații naturale, care pot fi prezente în cantități mici. Spre deosebire de aceasta, preparatele convenționale (policlonale) de anticorpi includ, de regulă, o multitudine de anticorpi diferiți dispunând de diferite secvențe de aminoacizi în domeniile lor variabile, în special în CDR-urile acestora, care adesea sunt specifice pentru diferiți epitopi. Determinativul „monoclonal” indică caracterul anticorpului ca fiind obținut dintr-o populație de anticorpi în mod  
45       esențial omogenă și acesta nu trebuie să fie interpretat ca necesitând obținerea anticorpului printr-un procedeu concret. De exemplu, pentru a fi utilizați în conformitate cu prezenta invenție, anticorpii monoclonali pot fi obținuți prin procedul hibridoma, descris pentru prima dată de Kohler și colab. [4], sau pot fi obținuți prin procedee ce țin de ADN recombinant [5]. „Anticorpii monoclonali” pot fi, de asemenea, izolați din bănci de anticorpi fagi folosind procedeele descrise  
50       în literatura de specialitate (Clackson et al. *Nature*, no 352, 1991, p. 624-628; Marks et al. *J. Mol. Biol.*, no 222, 1991, p. 581-597; Presta. *J. Allergy Clin. Immunol.*, no 116, 2005, p. 731).

Prezenta invenție se referă la anticorpii himerici anti-TIGIT {de exemplu, domeniul constant uman/domeniul variabil murin) și la procedeele de utilizare a acestora. Așa cum este utilizat în invenția propusă, un „anticorp himeric” este un anticorp având domeniul variabil dintr-un anticorp primar și domeniul constant dintr-un anticorp secundar, caracterizat prin aceea că  
55       anticorpul primar și anticorpul secundar provin de la diferite specii (US 4816567; Morrison et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1984, p. 6851-6855). De regulă, domeniile variabile sunt obținute dintr-un anticorp de animal experimental („anticorpul parental”), cum ar fi o rozătoare, iar secvențele domeniului constant sunt obținute de la anticorpi umani, astfel încât va fi mai puțin

probabil ca anticorpus himeric obținut să declanșeze un răspuns imun advers la un subiect uman, decât anticorpus parental (de exemplu, anticorpus de șoarece).

Prezenta invenție se referă la anticorpii umanizați anti-TIGIT și fragmentele acestora de legare a antigenului (de exemplu, anticorpii de șobolan sau de șoarece care au fost umanizați) și la procedeele de utilizare a lor. Invenția se referă la orice versiune umanizată a anticorpusului 14A6 (care cuprinde SECV. ID NR. 7 și 8), a anticorpusului 28H5 (care cuprinde SECV. ID NR. 63 și 64) și a anticorpusului 31C6 (care cuprinde SECV. ID NR. 94-95). Așa cum este utilizat în documentul de față, termenul „anticorpus umanizat” se referă la formele anticorpusilor conținând atât secvențe din anticorpii umani, cât și din anticorpii non-umani (de exemplu, de șobolan sau de șoarece). De regulă, anticorpusul umanizat poate cuprinde în esență toate sau cel puțin unul, și în mod tipic două, domenii variabile, în care toate sau aproape toate buclele hipervariabile corespund buclelor hipervariabile ale unei imunoglobuline non-umane și toate sau aproape toate regiunile cadru (FR) prezintă regiunile cadru din secvențele de imunoglobulină umană. Anticorpusul umanizat poate conține, în mod opțional, cel puțin o porțiune dintr-o regiune constantă de imunoglobulină umană (Fc).

De regulă, unitatea structurală de bază a anticorpusului cuprinde un tetramer. Fiecare tetramer include două perechi identice de lanțuri polipeptidice, caracterizat prin aceea că fiecare pereche posedă un lanț „ușor” (de aproximativ 25 kDa) și un lanț „greu” (de aproximativ 50...70 kDa). Porțiunea amino-terminală a fiecărui lanț include o regiune variabilă de la aproximativ 100 până la 110 sau mai mulți aminoacizi, responsabili, în primul rând, de recunoașterea antigenului. Porțiunea carboxi-terminală a lanțului greu poate defini o regiune constantă, responsabilă în principal de funcția efectoare. De regulă, lanțurile ușoare umane sunt clasificate ca lanțuri ușoare kappa și lambda. În plus, lanțurile grele umane sunt, de regulă, clasificate ca mu, delta, gama, alfa sau epsilon și definesc izotipul anticorpusului ca IgM, IgD, IgG, IgA și, respectiv, IgE. În interiorul lanțurilor ușoare și grele, regiunile variabile și cele constante sunt unite printr-o regiune „J” formată din aproximativ 12 sau mai mulți aminoacizi, în care lanțul greu include, de asemenea, o regiune „D” formată din aproximativ 10 sau mai mulți aminoacizi (Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y., 1989).

Regiunile variabile ale fiecărei perechi de lanț ușor/lanț greu formează situsul de legare a anticorpusului. Astfel, de regulă, un anticorpus intact posedă două situsuri de legare. Excepție fac anticorpii bifuncționali sau bispecifici, cele două situsuri de legare fiind, în general, la fel.

De regulă, atât domeniile variabile ale lanțurilor grele, cât și cele ale lanțurilor ușoare cuprind trei regiuni hipervariabile, denumite, de asemenea, și regiuni de determinare a complementarității (CDR-uri), localizate în regiunile cadru (FR) relativ conservative. CDR-urile sunt, de regulă, aliniate prin intermediul regiunilor cadru, permițând astfel legarea la un epitop specific. În general, de la N-terminal până la C-terminal, atât domeniile variabile ale lanțurilor ușoare, cât și domeniile variabile ale lanțurilor grele cuprind FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 și FR4. Atribuirea aminoacizilor la fiecare domeniu corespunde, în general, definițiilor prezentate în Sequences of Proteins of Immunological Interest (Kabat et al. National Institutes of Health, Bethesda, Md.; 5th ed.; NIH Publ. No. 91-3242, 1991; Kabat et al. Adv. Prot. Chem., no 32, 1978, p. 1-75; Kabat et al. J. Biol. Chem., no 252, 1977, p. 6609-6616; Chothia et al. J. Mol. Biol., no 196, 1987, p. 901-917; Chothia et al. Nature, no 342, 1989, p. 878-883).

Termenul „regiune hipervariabilă”, așa cum este utilizat în descrierea de față, se referă la resturile de aminoacizi ale unui anticorpus sau ale unui fragment al acestuia de legare a antigenului, responsabil de legarea antigenului. Regiunea hipervariabilă cuprinde resturi de aminoacizi dintr-o „regiune de determinare a complementarității” sau „CDR” (și anume, CDRL1, CDRL2 și CDRL3 în domeniul variabil al lanțului ușor și CDRH1, CDRH2 și CDRH3 în domeniul variabil al lanțului greu). (Kabat et al. National Institutes of Health, Bethesda, Md.; 5th ed.; NIH Publ. No. 91-3242, 1991) (care definește regiunile CDR ale unui anticorpus după secvență); (Chothia et al. J. Mol. Biol., no 196, 1987, p. 901-917) (care definește regiunile CDR ale unui anticorpus după structură). Așa cum este utilizat în prezentul document, termenul resturi „cadru” sau „FR” se referă la resturile domeniului variabil, altele decât resturile regiunilor hipervariabile, definite în descrierea de față ca resturi CDR.

Termenii „moleculă de acid nucleic izolată” sau „polinucleotidă izolată” definesc un ADN sau un ARN de origine genomică, ARNm, ADNc sau sintetică, sau unele combinații ale acestora care nu sunt asociate cu întreaga polinucleotidă sau cu o porțiune a acesteia, în care polinucleotida izolată se găsește în natură, sau este legată cu o polinucleotidă cu care nu este legată în natură. Pentru scopurile acestei descrieri, trebuie să se înțeleagă că „o moleculă de acid nucleic cuprinzând” o secvență concretă de nucleotide nu cuprinde cromozomi intacti.

Moleculele de acid nucleic izolate „cuprinzând” secvențele specifice de acid nucleic pot include, suplimentar la secvențele specifice, secvențe care codifică până la zece sau chiar până la douăzeci sau mai multe alte proteine sau porțiuni ale acestora, sau fragmente ale acestora, sau pot include secvențe reglatorii legate în mod operațional care controlează expresia regiunii

5 codificatoare a secvențelor specifice de acid nucleic și/sau pot include secvențe vectoriale.

Expresia „secvențe de control” se referă la secvențele de ADN, necesare pentru exprimarea unei secvențe de codificare legată în mod operabil într-un anumit organism gazdă. Secvențele de control potrivite pentru procariote, de exemplu, cele care includ un promotor, în

10 mod opțional, o secvență operatorie, și un situs de legare la ribozom. Se cunoaște că celulele eucariote folosesc promotori, semnalele de poliadenilare și amplificatori.

Un acid nucleic sau o polinucleotidă este „legată în mod operabil” atunci când este plasată într-o interacțiune funcțională cu o altă secvență de acid nucleic. De exemplu, ADN-ul pentru o presecvență sau un lider secretor este legat în mod operabil cu ADN-ul pentru o polipeptidă dacă el este exprimat ca o preproteină care participă la secreția polipeptidei; un

15 promotor sau un amplificator este legat operabil la o secvență de codificare dacă acesta influențează transcripția secvenței; sau un situs de legare a ribozomului este legat operabil la o

secvență de codificare dacă este poziționat astfel, încât să faciliteze translația secvenței. De regulă, dar nu întotdeauna, termenul „legat operabil” înseamnă că secvențele legate de ADN sunt contigue, iar în cazul unui lider secretor, acestea sunt contigue și în faza de citire. Cu toate

20 acestea, amplificatorii nu trebuie să fie în mod obligatoriu contigui. Legarea este realizată prin ligaturarea în situsuri convenabile de restricție. În cazul în care nu există astfel de situsuri, sunt

utilizate adaptoare oligonucleotidice sintetice sau linkerii, în conformitate cu practica unanim acceptată.

Așa cum este utilizat în prezentul document, expresiile „celulă”, „linie celulară” și „cultură celulară” sunt utilizate intersanșabil și toate aceste denumiri includ descendenții. Astfel, cuvintele „transformanți” și „celule transformate” includ subiectul primar de celulă și culturile

25 derivate din acestea, indiferent de numărul de transferuri. De asemenea, trebuie să se înțeleagă faptul că nu toți descendenții vor avea un conținut de ADN exact identic, datorită mutațiilor

deliberate sau spontane. Descendenții mutanți care au aceeași funcție sau activitate biologică sunt incluși în examinarea celulelor transformate inițial. În cazul în care sunt prevăzute denumiri

30 distincte, acest lucru va fi clar din context.

Termenul „secvența liniei germinale”, așa cum este utilizat în descrierea dată, se referă la o secvență din linia de secvențe non-rearanjate ale ADN-ului de imunoglobuline. Poate fi

35 utilizată orice sursă adecvată de secvențe non-rearanjate de imunoglobulină. Secvențele liniei germinale umane pot fi obținute, de exemplu, din bazele de date ale secvențelor liniei germinale

JOINSOLVER de pe web site-ul Institutului Național de Artrită și Boli musculo-scheletice și de piele al Institutului Național al Sănătății din Statele Unite ale Americii. Secvențele liniei germinale de șoarece pot fi obținute, de exemplu, după cum este descris în literatura de

40 specialitate (Giudicelli et al. Nucleic Acids Res, no 33, 2005, D256-D261).

Proprietățile fizice și funcționale ale anticorpilor anti-TIGIT, cu titlu de exemple

Prezenta invenție se referă la anticorpii anti-TIGIT și fragmentele acestora de legare a antigenului având caracteristicile funcționale și structurale specificate și la procedeele de

45 utilizare a anticorpilor sau a fragmentelor acestora de legare a antigenului în tratamentul sau prevenirea unor boli (de exemplu, tumoare malignă sau maladie infecțioasă).

Un „anticorp anti-TIGIT sau un fragment al acestuia de legare a antigenului, conform prezentei invenții” include: orice anticorp sau fragment al acestuia de legare a antigenului discutat în documentul de față (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 sau versiunile umanizate ale acestor anticorpi, descriși în Tabelul 4) sau o variantă a acestora (de exemplu, o variantă de

50 secvență sau o variantă funcțională); orice anticorp sau fragment de legare a antigenului cuprinzând una sau mai multe dintre CDR-urile prezentate în Tabelul 4; orice anticorp sau

fragment de legare a antigenului care se leagă la același epitop în TIGIT uman ca și anticorpii discutați în prezenta descriere (de exemplu, 14A6, 28H5 sau 31C6); și orice anticorp sau fragment de legare a antigenului care blochează încrucișat (parțial sau total) legarea cu TIGIT a

55 anticorpului, discutat în documentul de față, sau legarea cărora cu TIGIT este blocată încrucișat (parțial sau total) de către un anticorp discutat în documentul de față (de exemplu, 14A6, 28H5 sau 31C6).

Blocarea încrucișată a anticorpilor și a fragmentelor acestora de legare a antigenului poate fi identificată pe baza capacității lor de concurență încrucișată cu anticorpii conform prezentei

invenții în testele standard de legare (de exemplu, BIAcore, ELISA, citometrie în flux). De exemplu, pot fi utilizate testele ELISA standard în care o proteină recombinantă TIGIT (de exemplu, TIGIT uman) este imobilizată pe placă, unul dintre anticorpi este supus marcării fluorescente și este evaluată capacitatea anticorpilor nemarcați de a concura pentru legarea cu anticorpii marcați. Adicional sau în mod alternativ, poate fi utilizată analiza BIAcore pentru a evalua capacitatea anticorpilor de a concuți în mod încrucișat. Capacitatea unui anticorp testat de a inhiba legarea unui alt anticorp (de exemplu, anticorpii 14A6 sau 28H5, sau 31C6) cu TIGIT (de exemplu, TIGIT uman) demonstrează că anticorpii testat poate concura cu un alt anticorp (de exemplu, 14A6 sau 28H5, sau 31C6) pentru legarea la TIGIT (de exemplu, la TIGIT uman) și, astfel, în unele cazuri poate să se lege la același epitop de pe TIGIT (de exemplu, TIGIT uman) ca și anticorpii 14A6 sau 28H5, sau 31C6, sau la un epitop de suprapunere.

După cum s-a menționat anterior, anticorpii și fragmentele care se leagă la același epitop ca și oricare dintre anticorpii anti-TIGIT sau fragmentele acestora de legare a antigenului, conform prezentei invenții, fac parte, de asemenea, din prezenta invenție. Totodată, anticorpii care se leagă la un epitop suprapunându-se epitopului legat de către oricare dintre anticorpii anti-TIGIT, conform invenției, fac parte, de asemenea, din prezenta invenție. Există mai multe procedee disponibile pentru cartografierea anticorpilor pe antigenele țintă, printre care: spectrometria de masă H/D-Ex, cristalografia cu raze X, analiza PEPSCAN și mutageneza situs-direcționată. De exemplu, HDX (Hidrogen Deuterium Exchange), cuplat cu proteoliza și spectrometria de masă, poate fi utilizat pentru a determina epitopul unui anticorp pe un antigen specific Y. HDX-MS se bazează pe măsurarea precisă și compararea gradului de incorporare a deuteriului de către un antigen la incubarea de sine stătătoare cu D<sub>2</sub>O și în prezența anticorpului său la diferite intervale de timp. Deuteriul se schimbă cu hidrogenul pe scheletul amidic al proteinelor din zonele expuse, în timp ce regiunile antigenului, legat la anticorp, sunt protejate și vor arăta mai puțin sau lipsă de schimb după analiza a fragmentelor proteolitice, efectuată prin intermediul LC-MS/MS. Exemplul 9 ilustrează utilizarea HDX pentru cartografierea epitopului legat de către anticorpii 14A6.

Lațurile de imunoglobulină ale anticorpilor anti-TIGIT, conform prezentei invenții, precum și CDR-urile lor, includ, în calitate de exemple nelimitative, exemplele descrise în Tabelul 4 (SECV. ID NR. 1-30, 37-52, 57-83 sau 88-167). Prezenta invenție se referă la orice polipeptidă cuprinzând secvențele de aminoacizi sau constând din secvențele de aminoacizi din SECV. ID NR. 1-30, 37-52, 57-83 sau 88-167, și la nucleotidele recombinante care codifică astfel de polipeptide.

Domeniul de aplicare al prezentei invenții include anticorpii anti-TIGIT izolați și fragmentele acestora de legare a antigenului (de exemplu, anticorpii umanizați) conținând o variantă a lanțului de imunoglobulină prezentat în documentul de față, de exemplu, oricare dintre SECV. ID NR. 7-30, 37-52, 63-64, 94-95 sau 124-133; caracterizat prin aceea că varianta posedă una sau mai multe dintre următoarele caracteristici: (i) se leagă la TIGIT uman; (ii) reacționează încrucișat cu TIGIT cynomolgus și rhesus; (iii) blochează legarea TIGIT uman la CD155 uman și CD112 uman; (iv) sporește activarea celulelor T; (v) stimulează producția de IL-2 și IFN $\gamma$  a celulelor T antigen-specifice; (vi) blochează inducția de suprimare a activării celulelor T, indusă de legarea TIGIT cu liganzii înrudiți CD155 și CD112.

În alte variante de realizare, invenția solicitată se referă la anticorpii sau fragmentele acestora de legare a antigenului care se leagă cu TIGIT uman (de exemplu, anticorpii umanizați) și posedă domeniile V<sub>L</sub> și domeniile V<sub>H</sub> cu cel puțin 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% sau 99% identitate de secvență cu SECV. ID NR. 7-30, 37-52, 63-64, 94-95 sau 124-133; caracterizat prin aceea că varianta posedă legarea și proprietățile pretinse, de exemplu: (i) se leagă la TIGIT uman cu o valoare a K<sub>D</sub> de la aproximativ 1x 10<sup>-9</sup> M până la aproximativ 1x10<sup>-12</sup> M, determinată prin rezonanță plasmonică de suprafață (de exemplu, BIAcore) sau printr-o tehnică similară (de exemplu, KinExA sau OCTET); (ii) reacționează încrucișat cu TIGIT cynomolgus și rhesus; (iii) blochează legarea TIGIT uman la CD155 uman și CD112 uman; (iv) sporește activarea celulelor T; (v) stimulează producția de IL-2 și IFN $\gamma$  a celulelor T antigen-specifice; (vi) blochează inducția de suprimare a activării celulelor T, indusă prin legarea TIGIT cu liganzii înrudiți CD155 și CD112.

Expresiile „variante modificate conservativ” sau „substituție conservativă” se referă la substituțiile de aminoacizi dintr-o proteină cu alți aminoacizi posedând caracteristici similare (de exemplu, sarcină, dimensiune a lanțurilor laterale, hidrofobie/hidrofilie, conformație și rigiditate a coloanei vertebrale etc.), astfel încât modificările pot fi realizate, în mod frecvent, fără a modifica activitatea biologică a proteinei. Persoanele specializate în domeniul de referință

- cunosc faptul că, de regulă, substituțiile unice de aminoacizi, efectuate în regiunile neesențiale ale unei polipeptide, nu modifică în mod substanțial activitatea biologică (Watson et al. Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Pub. Co., 1987, p. 224 (ed. 4)). Totodată, substituțiile cu aminoacizi similari din punct de vedere structural sau funcțional sunt mai puțin susceptibile de a perturba activitatea biologică. Exemple de substituții conservative sunt prezentate în Tabelul 1.

Exemple de substituții conservative de aminoacizi  
Tabelul 1

| Resturi inițiale | Substituții conservative |
|------------------|--------------------------|
| Ala (A)          | Gly; Ser                 |
| Arg (R)          | Lys; His                 |
| Asn (N)          | Gln; His                 |
| Asp (D)          | Glu; Asn                 |
| Cys (C)          | Ser; Ala                 |
| Gln (Q)          | Asn                      |
| Glu (E)          | Asp; Gln                 |
| Gly (G)          | Ala                      |
| His (H)          | Asn; Gln                 |
| Ile (I)          | Leu; Val                 |
| Leu (L)          | Ile; Val                 |
| Lys (K)          | Arg; His                 |
| Met (M)          | Leu; Ile; Tyr            |
| Phe (F)          | Tyr; Met; Leu            |
| Pro (P)          | Ala                      |
| Ser (S)          | Thr                      |
| Thr (T)          | Ser                      |
| Trp (W)          | Tyr; Phe                 |
| Tyr (Y)          | Trp; Phe                 |
| Val (V)          | Ile; Leu                 |

10

- Variantele funcțional-conservative ale anticorpilor conform invenției sunt, de asemenea, incluse în prezenta invenție. Termenul „variante funcțional-conservative”, așa cum este utilizat în prezenta descriere, se referă la anticorpii sau fragmentele în care unul sau mai multe resturi de aminoacizi au fost înlocuite fără a modifica proprietatea preconizată, cum ar fi afinitatea și/sau specificitatea antigenului. De asemenea, variantele includ, fără a se limita la aceasta, înlocuirea unui aminoacid cu un altul având proprietăți similare, cum ar fi substituțiile conservative de aminoacizi din Tabelul 1. De asemenea, sunt prezentate polipeptidele izolate care cuprind domeniile V<sub>L</sub> ale anticorpilor anti-TIGIT, conform invenției (de exemplu, SECV. ID NR. 8, 25-30 și 48-52), și polipeptidele izolate care cuprind domeniile V<sub>H</sub> (de exemplu, SECV. ID NR. 7, 9-24 și 37-47) ale anticorpilor anti-TIGIT, conform invenției, având până la 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 sau mai multe substituții de aminoacizi. Sunt prezentate, de asemenea, polipeptidele izolate care cuprind domeniile V<sub>L</sub> ale anticorpilor anti-TIGIT, conform prezentei invenții (de exemplu, SECV. ID NR. 64), și polipeptidele izolate cuprinzând domeniile V<sub>H</sub> (de exemplu, SECV. ID Nr. 63) ale anticorpilor anti-TIGIT conform invenției având până la 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 sau mai multe substituții de aminoacizi. De asemenea, sunt prezentate polipeptidele izolate care cuprind domeniile V<sub>L</sub> ale anticorpilor anti-TIGIT, conform invenției (de exemplu, SECV. ID NR. 95 și 130-133), și polipeptidele izolate cuprinzând domeniile V<sub>H</sub> (de exemplu, SECV. ID NR. 94 și 124-129) ale anticorpilor anti-TIGIT, conform invenției, având până la 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 sau mai multe substituții de aminoacizi.

- Intr-o altă variantă de realizare, este prezentat un anticorp sau un fragment al acestuia de legare a antigenului care se leagă la TIGIT și conțin domeniile V<sub>L</sub> și domeniile V<sub>H</sub> cu cel puțin 99% 98%, 97%, 96%, 95%, 90%, 85%, 80% sau 75% identitate de secvență cu una sau mai multe dintre domeniile V<sub>L</sub> și domeniile V<sub>H</sub>, descrise în prezenta invenție, și posedă o legătură specifică cu TIGIT. Într-o altă variantă de realizare, anticorpul de legare sau fragmentul acestuia

35

de legare a antigenului, conform prezentei invenții, cuprinde domeniile  $V_L$  și  $V_H$  (cu și fără secvență de semnal) având până la 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 sau mai multe substituții de aminoacizi, și posedă o legătură specifică cu TIGIT.

5

#### Polinucleotide și polipeptide

Prezenta invenție se referă, totodată, la polinucleotidele codificând oricare dintre polipeptidele sau lanțurile de imunoglobulină ale anticorpilor anti-TIGIT și fragmentele acestora de legare a antigenului, conform invenției. De exemplu, prezenta invenție se referă la polinucleotidele care codifică aminoacizii descriși în SECV. ID NR. 1-30, 37-52, 57-83 și 88-167, precum și la polinucleotidele care hibridizează cu aceștia și, de asemenea, la orice polipeptidă codificată de către o astfel de polinucleotidă hibridizantă. Într-o variantă de realizare, invenția se referă la o secvență de acid nucleic cuprinzând sau constând în mod esențial din SECV. ID NR. 84 sau SECV. ID NR. 85.

De regulă, polinucleotidele hibridizează în condiții de stringență redusă, moderată sau ridicată și codifică anticorpii sau fragmentele acestora de legare a antigenului care mențin capacitatea de a se lega cu TIGIT (uman, maimuțe rhesus și/sau maimuțe cynomolgus, de exemplu, *Macaca fascicularis*). Molecula primei polinucleotide este „capabilă de hibridizare” cu molecula celei de-a doua polinucleotide atunci când forma monocatenară a moleculei primei polinucleotide poate hibridiza cu molecula celei de-a doua polinucleotide în condiții adecvate de temperatură și forță ionică a soluției (Sambrook și colab.). Condițiile de temperatură și putere ionică determină „stringența” hibridizării. Condițiile tipice de stringență scăzută de hibridizare includ 55°C, 5X SSC, 0,1% SDS și absența formamidei; sau 30% formamidă, 5X SSC, 0,5% SDS la temperatura de 42°C. Condițiile tipice de stringență moderată de hibridizare prezintă 40% formamidă, 5X sau 6X SSC și 0,1% SDS la temperatura de 42°C. Condițiile de stringență înaltă de hibridizare prezintă 50% formamidă, 5X sau 6X SSC la temperatura de 42°C sau, în mod opțional, la o temperatură mai ridicată (de exemplu, 57°C, 59°C, 60°C, 62°C, 63°C, 65°C sau 68°C). De regulă, SSC prezintă 0,15M NaCl și 0,015M citrat de sodiu. Hibridizarea necesită ca cele două polinucleotide să conțină secvențe complementare, deși, în funcție de stringența hibridizării, sunt posibile nepotriviri între baze. O stringență adecvată pentru hibridizarea polinucleotidelor depinde de lungimea polinucleotidelor și de gradul de complementaritate, variabile, bine cunoscute în domeniul de referință. Cu cât este mai mare gradul de similaritate sau omologie dintre două secvențe de nucleotide, cu atât este mai mare gradul de stringență, la care acizii nucleici se pot hibridiza. Pentru hibridizii cu o lungime mai mare de 100 de nucleotide, au fost dezvoltate ecuații pentru calcularea temperaturii de topire (de văzut Sambrook și colab., mai sus, 9.50-9.51). Pentru hibridizarea cu polinucleotide mai scurte, de exemplu, oligonucleotide, condiția nepotrivirilor devine mai importantă și lungimea oligonucleotidei determină specificitatea acesteia (de văzut Sambrook și colab., mai sus, 11.7-11.8).

Intr-o altă variantă de realizare, este prezentată o polinucleotidă izolată, de exemplu, un ADN care codifică lanțurile polipeptidice ale anticorpilor izolați sau ale fragmentelor acestora de legare a antigenului, prezentate în descrierea de față. Într-o variantă de realizare, polinucleotida izolată codifică anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului care cuprinde cel puțin un domeniu variabil ( $V_L$ ) al lanțului ușor al unei imunoglobuline mature, conform prezentei invenții, și/sau cel puțin un domeniu variabil ( $V_H$ ) al lanțului ușor al unei imunoglobuline mature, conform prezentei invenții. În unele variante de realizare, polinucleotida izolată codifică atât lanțul ușor, cât și lanțul greu pe o singură moleculă polinucleotidică, iar în alte variante de materializare, lanțurile ușoare și lanțurile grele sunt codificate pe molecule polinucleotidice separate. Într-o altă variantă de materializare, polinucleotida codifică suplimentar o secvență de semnal.

Intr-o variantă de realizare, invenția se referă la o polinucleotidă izolată care codifică domeniul variabil ( $V_H$ ) al lanțului greu al anticorpului sau al fragmentului acestuia de legare a antigenului conținând CDR-H1 (SECV. ID NR. 1), CDR-H2 (SECV. ID NR. 2) și CDR-H3 (SECV. ID NR. 3 sau 79, sau 80, sau 81, sau 82, sau 83, sau 140).

Intr-o variantă de materializare, invenția se referă la o polinucleotidă izolată care codifică domeniul variabil ( $V_L$ ) al lanțului ușor al anticorpului sau al fragmentului acestuia de legare a antigenului cuprinzând CDR-L1 (SECV. ID NR. 4), CDR-L2 (SECV. ID NR. 5 sau 65, sau 66, sau 67, sau 68, sau 69, sau 70, sau 71, sau 72, sau 73, sau 141) și CDR-L3 (SECV. ID NR. 6 sau 74, sau 75, sau 76, sau 77, sau 78).

55

Intr-o variantă de realizare, invenția se referă la o polinucleotidă izolată care codifică domeniul variabil ( $V_H$ ) al lanțului greu al imunoglobulinei din SECV. ID NR. 7.

Intr-un variantă de realizare, invenția se referă la o polinucleotidă izolată care codifică domeniul variabil ( $V_L$ ) al lanțului greu al imunoglobulinei din SECV. ID NR. 8.

5 Intr-o variantă de realizare, invenția se referă la o polinucleotidă izolată care codifică domeniul variabil ( $V_H$ ) al lanțului greu al imunoglobulinei din oricare dintre SECV. ID NR. 9-24 sau 37-47.

10 Intr-o variantă de realizare, invenția se referă la o polinucleotidă izolată care codifică domeniul variabil ( $V_L$ ) al lanțului greu al imunoglobulinei din oricare dintre SECV. ID NR. 25-30 sau 48-52.

Intr-o variantă de realizare, invenția se referă la o polinucleotidă izolată care codifică domeniul variabil ( $V_H$ ) al lanțului greu al anticorpului sau al fragmentului acestuia de legare a antigenului cuprinzând CDR-H1 (SECV. ID NR. 57), CDR-H2 (SECV. ID NR. 58) și CDR-H3 (SECV. ID NR. 59).

15 Intr-o variantă de realizare, invenția se referă la o polinucleotidă izolată care codifică domeniul variabil ( $V_L$ ) al lanțului ușor al anticorpului sau al fragmentului acestuia de legare a antigenului cuprinzând CDR-L1 (SECV. ID NR. 60), CDR-L2 (SECV. ID NR. 61) și CDR-L3 (SECV. ID NR. 62).

20 Intr-o variantă de realizare, invenția se referă la o polinucleotidă izolată care codifică domeniul variabil ( $V_H$ ) al lanțului greu al imunoglobulinei din SECV. ID NR. 63.

Intr-o variantă de realizare, invenția se referă la o polinucleotidă izolată care codifică domeniul variabil ( $V_L$ ) al lanțului greu al imunoglobulinei din SECV. ID NR. 64.

25 Intr-o variantă de realizare, invenția se referă la o polinucleotidă izolată care codifică domeniul variabil ( $V_H$ ) al lanțului greu al anticorpului sau al fragmentului acestuia de legare a antigenului cuprinzând CDR-H1 (SECV. ID NR. 88), CDR-H2 (SECV. ID NR. 89, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 134 sau 135) și CDR-H3 (SECV. ID NR. 90).

30 Intr-o variantă de realizare, invenția se referă la o polinucleotidă izolată care codifică domeniul variabil ( $V_L$ ) al lanțului ușor al anticorpului sau al fragmentului acestuia de legare a antigenului cuprinzând CDR-L1 (SECV. ID NR. 91), CDR-L2 (SECV. ID NR. 92, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122 sau 123) și CDR-L3 (SECV. ID NR. 93).

Intr-o variantă de realizare, invenția se referă la o polinucleotidă izolată care codifică domeniul variabil ( $V_H$ ) al lanțului greu al imunoglobulinei din SECV. ID NR. 94.

35 Intr-o variantă de realizare, invenția se referă la o polinucleotidă izolată care codifică domeniul variabil ( $V_L$ ) al lanțului greu al imunoglobulinei din SECV. ID NR. 95.

Intr-o variantă de realizare, invenția se referă la o polinucleotidă izolată care codifică domeniul variabil ( $V_H$ ) al lanțului greu al imunoglobulinei din oricare dintre SECV. ID NR. 124-129.

40 Intr-o variantă de realizare, invenția se referă la o polinucleotidă izolată care codifică domeniul variabil ( $V_L$ ) al lanțului greu al imunoglobulinei din oricare dintre SECV. ID NR. 130-133.

Intr-o variantă de realizare, invenția se referă la o polinucleotidă izolată care codifică domeniul variabil ( $V_H$ ) al lanțului greu al imunoglobulinei din SECV. ID NR. 127.

45 Intr-o variantă de realizare, invenția se referă la o polinucleotidă izolată care codifică domeniul variabil ( $V_H$ ) al lanțului greu al imunoglobulinei din SECV. ID Nr. 128.

Intr-o variantă de realizare, invenția se referă la o polinucleotidă izolată care codifică domeniul variabil ( $V_L$ ) al lanțului greu al imunoglobulinei din SECV. ID NR. 130.

Intr-o variantă de realizare, invenția se referă la o polinucleotidă izolată care codifică domeniul variabil ( $V_L$ ) al lanțului greu al imunoglobulinei din SECV. ID NR. 132.

50 Intr-o variantă de realizare, invenția se referă la o polinucleotidă izolată care codifică domeniul variabil ( $V_L$ ) al lanțului greu al imunoglobulinei din SECV. ID NR. 133.

55 Prezenta invenție se referă, de asemenea, la vectori, de exemplu, la vectori de expresie, cum ar fi plasmide, cuprinzând polinucleotidele izolate, conform invenției, caracterizate prin aceea că polinucleotida este legată în mod operațional cu secvențele de control recunoscute de către o celulă gazdă atunci când celula gazdă este transfectată de către vector. De asemenea, sunt prezentate celule gazdă cuprinzând un vector, conform prezentei invenții, și procedee de obținere a anticorpului sau a fragmentului acestuia de legare a antigenului, sau polipeptida descrisă în documentul de față cuprinzând cultivarea unei celule gazdă care adăpostește un vector de expresie sau un acid nucleic codificând lanțurile imunoglobulinice ale anticorpului sau ale

fragmentului acestuia de legare a antigenului în mediul de cultură, și izolarea anticorpului sau a fragmentului acestuia de legare a antigenului din celula gazdă sau din mediul de cultură.

De asemenea, prezenta invenție se referă la polipeptide, de exemplu, la polipeptidele imunoglobulinei cuprinzând secvențe de aminoacizi care sunt cel puțin cu circa 75% identice, 80% identice, mai preferabil cel puțin cu circa 90% identice și cel mai preferabil cel puțin cu circa 95% identice (de exemplu, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%) cu secvențele de aminoacizi ale anticorpilor prezentați în invenția de față, atunci când comparația se realizează prin intermediul algoritmului BLAST, în care parametrii algoritmului sunt selectați ca să asigure cea mai mare corespundere între secvențele respective pe întreaga lungime a secvențelor respective de referință (de exemplu, prag așteptare: 10; mărimea cuvântului: 3, corespunderea maximă de coincidențe în intervalul unei solicitări: 0; matrice BLOSUM 62, costuri de acces: existență 11, extensie 1; ajustarea structurală condiționată a matricii de puncte).

Identitatea secvenței se referă la gradul în care aminoacizii din două polipeptide sunt identici în poziții echivalente, atunci când cele două secvențe sunt aliniate în mod optimal.

Algoritmii BLAST se utilizează frecvent pentru analiza secvențelor: (Altschul et al. FEBS J., no 272 (20), 2005, p. 5101-5109; Altschul S.F. et al. J. Mol. Biol., no 215, 1990, p. 403-410; Gish, W. et al. Nature Genet., no 3, 1993, p. 266-272; Madden T.L. et al. Meth. Enzymol., no 266, 1996, p. 131-141; Madden T.L. et al. Meth. Enzymol., no 266, 1996, p. 131-141; Zhang, J. et al. Genome Res., no 7, 1997, p. 649-656; Wootton, J.C. et al. Comput. Chem., no 17, 1993, p. 149-163; Hancock J.M. et al. Comput. Appl. Biosci., no 10, 1994, p. 67-70; Dayhoff M.O. et al. "A model of evolutionary change in proteins." in Atlas of Protein Sequence and Structure, vol 5, supl. 3. M.O. Dayhoff (ed.), Natl. Biomed. Res. Found., Washington, DC., 1978, p. 345-352; Schwartz R.M. et al. "Matrices for detecting distant relationships." in Atlas of Protein Sequence and Structure, vol 5, supl. 3. M.O. Dayhoff (ed.), Natl. Biomed. Res. Found., Washington, DC. 1978, p. 353-358; Altschul S.F. J. Mol. Biol., no 219, 1991, p. 555-565; States D.J. et al. Methodes, no 3, 1991, p. 66-70; Henikoff S. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, no 89, 1992, p. 10915-10919; Altschul S.F. et al. J. Mol. Evol., no 36, 1993, p. 290-300; Karlin S. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, no 87, 1990, p. 2264-2268; Karlin S. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, no 90, 1993, p. 5873-5877; Dembo A. et al. Ann. Prob., no 22, 1994, p.2022-2039; Altschul S.F. "Evaluating the statistical significance of multiple distinct local alignments." in Theoretical and Computational Methods in Genome Research (S. Suhai, ed.), Plenum, New York; 1997, p. 1-14).

#### Afinitatea legării

Cu titlu de exemplu, însă fără a se limita la acesta, anticorpul și fragmentele acestora de legare a antigenului, descriși în prezenta invenție, pot lega TIGIT uman cu o valoare a  $K_D$  de cel puțin circa  $1 \times 10^{-9}$  M (și anume, o valoare a  $K_D$  de  $1 \times 10^{-9}$  M sau mai mică), determinată prin rezonanță plasmonică de suprafață (de exemplu, BIACORE) sau printr-o tehnică similară (de exemplu, KinExA sau OCTET). Într-o variantă de realizare, anticorpul și fragmentele acestora de legare a antigenului, dezvoltăți în descieri de față, pot lega TIGIT uman cu o valoare a  $K_D$  de la cel puțin aproximativ  $1 \times 10^{-9}$  M până la aproximativ  $1 \times 10^{-12}$  M, determinată prin rezonanță plasmonică de suprafață (de exemplu, BIACORE) sau printr-o tehnică similară (de exemplu, KinExA sau OCTET). Într-o variantă de materializare, anticorpul și fragmentele acestora de legare a antigenului, dezvoltăți în documentul de față, pot lega TIGIT uman cu o valoare a  $K_D$  de la aproximativ  $1 \times 10^{-9}$  M până la aproximativ  $1 \times 10^{-12}$  M, determinată prin rezonanță plasmonică de suprafață (de exemplu, BIACORE) sau printr-o tehnică similară (de exemplu, KinExA sau OCTET). Într-o variantă de materializare, anticorpul și fragmentele acestora de legare a antigenului, dezvoltăți în descieri de față, pot lega TIGIT uman cu o valoare a  $K_D$  de cel puțin aproximativ 50 pM (și anume, cu o valoare a  $K_D$  de aproximativ 50 pM sau mai mică), determinată prin intermediul BIACORE sau al unei tehnici similare. Într-o variantă, anticorpul și fragmentele acestora de legare a antigenului, dezvoltăți în lucrarea de față, pot lega TIGIT uman cu o valoare a  $K_D$  de cel puțin circa 10 pM (și anume, cu o valoare a  $K_D$  de aproximativ 10 pM și mai mică), determinată prin BIACORE sau printr-o tehnică similară. Într-o variantă de realizare, anticorpul și fragmentele acestora de legare a antigenului, conform invenției, pot lega TIGIT uman cu un  $K_D$  de la aproximativ 50 pM până la aproximativ 1 pM, precum a fost determinat prin BIACORE sau printr-o tehnică similară.

## Activarea celulelor imunitare

In unele variante de materializare, anticorpii sau fragmentele acestora de legare a antigenului, conform invenției, sporesc activitatea celulelor imune. Creșterea activității celulelor imune poate fi detectată folosind orice metodă cunoscută în domeniul de referință. Într-o variantă de realizare, creșterea activității celulelor imune poate fi detectată prin măsurarea proliferării celulelor imune. De exemplu, creșterea activității celulelor T poate fi detectată prin măsurarea proliferării celulelor T sau a evenimentelor de transducție a semnalului, cum ar fi fosforilarea tirozinică a receptorilor imuni sau a kinazelor din aval care transmit semnalele spre regulatorii transcripționali. În alte exemple de realizare, creșterea activității celulelor imune poate fi detectată prin măsurarea funcției citotoxice a celulelor CTL sau NK pe celulele țintă specifice sau pe răspunsurile citokinei IFN $\gamma$ , care sunt asociate cu stimularea imunității antitumorale. În alte variante de realizare, creșterea activității celulelor imune poate fi detectată prin măsurarea activării celulelor T *ex vivo* într-o probă obținută de la subiect. Într-o variantă de realizare, creșterea activității celulelor T este determinată prin: (i) măsurarea producției induse SEB (enterotoxină B *Staphylococcus*) a uneia sau a mai multor citokine pro-inflamatorii, selectate din grupul format din: IL-2, TNF $\alpha$ , IL-17, IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , GM-CSF, RANTES, IL-6, IL-8, IL-5 și IL-13; sau (ii) prin măsurarea reacțiilor limfocitare mixte sau prin stimularea directă cu mAb anti-CD3 a transducției semnalului receptorului celulelor T (TCR) pentru a induce producerea citokinei, selectate din grupul constând din: IL-2, TNF $\alpha$ , IL-17, IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , GM-CSF, RANTES, IL-6, IL-8, IL-5 și IL-13. In anumite variante de realizare, anticorpus anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform prezentei invenții, poate stimula producția de IL-2 și/sau IFN $\gamma$  a celulelor T antigen-specifice de cel puțin 1,5 ori.

Prezenta invenție se referă la anticorpii antagoniști anti-TIGIT, la fragmentele acestora de legare a antigenului și la procedeele de utilizare a lor, de exemplu, la anticorpii antagoniști anti-TIGIT umanizați și la fragmentele acestora. Anticorpus antagonist anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului antagonizează activitatea TIGIT uman, de exemplu, prin inhibarea legării TIGIT cu CD155 și CD112, și inhibarea transducției semnalului ITIM funcțional de către TIGIT în procesul de legare la CD155 și CD112. Măsurarea activității antagoniste anti-TIGIT poate fi evaluată demonstrând blocarea supresiei celulelor T după activarea TCR, indusă de ligaturarea TIGIT cu liganzii înrudiți CD155 și CD112. Astfel, într-o variantă de realizare a răspunsurilor sporite, tratamentul cu anticorpi antagoniști anti-TIGIT este capabil de a salva răspunsurile IL-2 până la nivelurile observate în celulele T, non-reprimate prin inducția TIGIT prin intermediul CD155 sau CD112. La un nivel de activare mai preferabil, după tratamentul cu un anticorpus antagonist anti-TIGIT răspunsurile pot crește până la un nivel mai mare decât răspunsurile celulelor T non-reprimate prin intermediul CD155 sau CD112.

## Capacitatea anticorpilor anti-hTIGIT de a bloca legarea cu hCD155 și hCD112

In unele variante de realizare, anticorpii anti-TIGIT sau fragmentele acestora de legare a antigenului din invenția de față sunt capabili de a bloca legarea TIGIT uman la CD155 uman și CD112 uman. Capacitatea de a bloca legarea TIGIT uman la CD155 uman și CD112 uman poate fi determinată folosind orice procedeu cunoscut în domeniul de referință. Într-o variantă de realizare, capacitatea anticorpilor de a bloca legarea TIGIT uman la CD155 uman și CD112 uman este determinată cu ajutorul unui test ELISA, după cum este descris în Exemplul 2.

## Procedee de obținere a anticorpilor și a fragmentelor acestora de legare a antigenului

Celulele hibridoma care produc anticorpi anti-TIGIT monoclonali parentali (de exemplu, de șobolan sau de șoarece) sau fragmente ale acestora de legare a antigenului, discutați în invenția de față, pot fi obținuți prin procedeele cunoscute în domeniul de referință. Astfel de hibridoame izolate sunt parte a prezentei invenții. Aceste procedee includ, dar nu se limitează la acestea, procedeul hibridoma (Kohler et al. Nature, no 256, 1975, p. 495-497), precum și procedeul trioma (Hering et al. Biomed. Biochem. Acta., no 47, 1988, p. 211-216; Hagiwara et al. Hum. Antibod. Hybridomas, no 4, 1993, p. 15), procedeul hibridoma cu celule B umane (Kozbor et al. Immunology Today, no 4, 1983, p. 72; Cote et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, no 80, 1983, p. 2026-2030), procedeul hibridoma-EBV (Cole et al. Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., 1985, p. 77-96) și electrofuziunea pe bază de câmp electric folosind un electroporator de fuziune a celulelor cu cameră mare de la Cyto Pulse (Cyto Pulse Sciences, Inc., Glen Burnie, Md). De preferință, splenocitele de șoarece sunt izolate și fuzionate cu ajutorul PEG sau prin electrofuziune cu o linie de celule de mielom de șoarece bazate pe protocoale standard. Hibridoamele rezultate pot fi mai apoi examinate pentru producerea de

anticorpi antigen-specifici. De exemplu, suspensiile de celule separate de limfocite splenice de la șoareci imunizați pot fi fuzionate cu o șesime din numărul de celule non-secretoare de mielom de șoarece P3X63-Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) cu ajutorul 50% PEG. Celulele pot fi placate la aproximativ  $2 \times 10^5$  celule/ml pe o placă de microtitrare cu fundul plat, cu o incubare ulterioară de două săptămâni într-un mediu selectiv conținând 20% ser Clona fetal, 18% de mediu condiționat „653”, 5% origen (IGEN), 4 mM L-glutamină, 1 mM L-glutamină, 1 mM piruvat de sodiu, 5 mM HEPES, 0,055 mM 2-mercaptoetanol, 50 unități/ml penicilină, 50 mg/ml streptomycină, 50 mg/ml gentamicină și 1X HAT (Sigma, HAT se adaugă peste 24 de ore după fuziune). După două săptămâni, celulele pot fi cultivate într-un mediu în care HAT este substituit cu HT. După aceasta, anumite godeuri pot fi analizate prin testul ELISA pentru anticorpii monoclonali IgG anti-TIGIT. După ce se produce o creștere extensivă a hibridomei, mediul poate fi observat, de regulă, peste 10...14 zile. Hibridoamele secretoare de anticorpi pot fi replantate, verificate din nou, și dacă sunt încă pozitive pentru IgG umană, anticorpii monoclonali anti-TIGIT pot fi subclonați cel puțin de două ori prin diluție limitativă. După aceasta, subclonele stabile pot fi cultivate *in vitro* pentru a genera cantități mici de anticorpi în mediul tisular de cultură pentru caracterizare.

Astfel, prezenta invenție include procedeele de producere a unui anticorp anti-TIGIT sau a unui fragment al acestuia de legare a antigenului, conform invenției, cuprinzând cultivarea celulelor de hibridom care exprimă anticorpul sau fragmentul acestuia în condiții favorabile pentru o astfel de expresie și, în mod opțional, izolarea anticorpului sau a fragmentului din hibridom și/sau din mediul de creștere (de exemplu, mediul de cultură celulară).

Anticorpii anti-TIGIT, devăluți în prezenta invenție, pot fi produși, de asemenea, într-un mod recombinant (de exemplu, în sistemul de expresie *E. coli*/T7, în sistemul de expresie a celulelor de mamifer sau în sistemul de expresie a eucariotelor inferioare). În această variantă de realizare, acizii nucleici care codifică moleculele de imunoglobulină ale anticorpilor, conform invenției (de exemplu,  $V_H$  sau  $V_L$ ) pot fi inserați într-o plasmidă pe bază de pET și exprimați în sistemul *E. coli*/T7. De exemplu, prezenta invenție se referă la procedee de exprimare a unui anticorp sau a unui fragment al acestuia de legare a antigenului, sau a unui lanț de imunoglobulină al acestuia într-o celulă gazdă (de exemplu, celula gazdă bacteriană, cum ar fi *E. coli*, cum ar fi BL21 sau BL21DE3) cuprinzând exprimarea ARN-polimerazei T7 într-o celulă cuprinzând, de asemenea, o polinucleotidă care codifică lanțul de imunoglobulină, legat în mod funcțional la un promotor T7. De exemplu, într-o variantă de realizare a invenției, o celulă gazdă bacteriană, cum ar fi *E. coli*, include o polinucleotidă care codifică gena ARN-polimerazei T7, legată în mod funcțional la un promotor *lac* și expresia polimerazei și a lanțului este indusă prin incubarea celulei gazdă cu IPTG (izopropil-beta-D-tiogalactopiranozidă).

Există mai multe procedee de producere a anticorpilor recombiinați, cunoscute în domeniul de referință. Un exemplu de procedee de producere recombinantă a anticorpilor este dezvăluit în literatura brevetară (US 4816567).

Transformarea poate fi realizată prin orice procedeu cunoscut de introducere a polinucleotidelor într-o celulă gazdă. Procedeele de introducere a polinucleotidelor heterologe în celule de mamifer sunt bine cunoscute în domeniul discutat și includ transfecția mediată de dextran, precipitarea cu fosfat de calciu, transfecția mediată de polibren, fuziunea protoplastelor, electroporarea, încapsularea polinucleotidei(lor) în lipozomi, injectarea biolistică și microinjectarea directă a ADN-ului în nucleee. Totodată, moleculele de acid nucleic pot fi introduse în celulele de mamifer prin vectorii virali. Procedeele de transformare a celulelor sunt bine cunoscute în domeniul de referință al tehnicii (US 4399216; US 4912040; US 4740461; US 4959455).

Astfel, prezenta invenție se referă la procedeele recombinante de producere a unui anticorp anti-TIGIT sau a unui fragment al acestuia de legare a antigenului, conform prezentei invenții, sau a unui lanț imunoglobulinic al acestuia cuprinzând introducerea unei polinucleotide care codifică una sau mai multe lanțuri de imunoglobulină ale anticorpului sau ale fragmentului (de exemplu, lanțul greu și/sau lanțul ușor de imunoglobulină); cultivarea celulei gazdă (de exemplu, CHO sau *Pichia* sau *Pichia pastoris*) în condiții favorabile pentru o astfel de expresie și, în mod opțional, izolarea anticorpului sau a fragmentului, sau a lanțului din celula gazdă și/sau din mediul în care este cultivată celula gazdă.

Anticorpii anti-TIGIT pot fi, de asemenea, sintetizați prin oricare dintre procedeele prezentate în brevetul US 6331415.

Celulele gazdă eucariote și procariote incluzând celulele de mamifer în calitate de gazdă pentru exprimarea anticorpilor sau a fragmentelor, sau a lanțurilor de imunoglobulină, devăluite

în invenția propusă, sunt bine cunoscute în domeniul de referință și includ o multitudine de linii celulare imortalizate, disponibile în American Type Culture Collection (ATCC). Acestea includ, *inter alia*, celule ovariene de hamster chinezesc (CHO), NSO, celule SP2, celule HeLa, celule de rinichi de la pui de hamster (BHK), celule de rinichi de maimuță (COS), celule de carcinom hepatocelular uman (de exemplu, Hep G2), celule A549, celule 3T3, celule HEK-293 și o serie de alte linii celulare. Celulele gazdă de mamifer includ celule umane, de șoarece, șobolan, câine, maimuță, porc, capră, bovină, cal și hamster. Liniile celulare, preferate în mod deosebit, sunt selectate prin determinarea liniilor celulare care au niveluri înalte de exprimare. Alte linii celulare, care pot fi folosite, sunt liniile celulare de insecte, cum ar fi celulele Sf9, celulele amfibiene, celulele bacteriene, celulele de plante și celulele fungice. Celulele fungice includ celule de drojdii și celule de fungi filamentosi, inclusiv, de exemplu, *Pichia pastoris*, *Pichia finlandica*, *Pichia trehalophila*, *Pichia koclamae*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia minuta* (*Ogataea minuta*, *Pichia lindneri*), *Pichia opuntiae*, *Pichia thermotolerans*, *Pichia salictaria*, *Pichia guercuum*, *Pichia pijperi*, *Pichia stiptis*, *Pichia methanolica*, *Pichia sp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces sp.*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces sp.*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida albicans*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei*, *Chrysosporium lucknowense*, *Fusarium sp.*, *Fusarium gramineum*, *Fusarium venenatum*, *Physcomitrella patens* și *Neurospora crassa*. *Pichia sp.*, orice *Saccharomyces sp.*, *Hansenula polymorpha*, orice *Kluyveromyces sp.*, *Candida albicans*, orice *Aspergillus sp.*, *Trichoderma reesei*, *Chrysosporium lucknowense*, orice *Fusarium sp.*, *Yarrowia lipolytica* și *Neurospora crassa*. Când vectorii de expresie recombinanți care codifică lanțul greu sau o porțiune a acestuia de legare a antigenului, sau un fragment al acestuia, lanțul ușor și/sau fragmentul acestuia de legare a antigenului sunt introduși în celule gazdă de mamifere, anticorpii sunt obținuți prin cultivarea celulelor gazdă o perioadă de timp suficientă pentru a permite exprimarea anticorpului sau a fragmentului, sau a lanțului din celulele gazdă, sau secreția în mediul de cultură în care sunt crescute celulele gazdă.

Anticorpii și fragmentele acestora de legare a antigenului, și lanțurile de imunoglobulină pot fi izolate din mediul de cultură folosind procedeele standard de purificare a proteinelor. Totodată, expresia anticorpilor și a fragmentelor acestora de legare a antigenului și a lanțurilor de imunoglobulină, în conformitate cu invenția de față, (sau a altor părți din acestea) din liniile celulare de producție poate fi îmbunătățită utilizând o serie de tehnici cunoscute. De exemplu, sistemul de expresie a genei glutamin sintetază (sistemul GS) este o abordare general recunoscută pentru ameliorarea exprimării în anumite condiții. Sistemul GS este discutat în integritate sau parțial în literatura brevetară (EP 0216846; EP 0256055; EP 0323997; EP 89303964.4). Astfel, într-un exemplu de realizare a invenției, celulele gazdă de mamifer (de exemplu, CHO) sunt lipsite de gena glutamin sintetază și acestea sunt cultivate în absența glutaminei într-un mediu unde polinucleotida care codifică lanțul de imunoglobulină cuprinde, totuși, o genă glutamin sintetază complementând lipsa genei în celula gazdă.

Prezenta invenție se referă la procedee de purificare a unui anticorp anti-TIGIT sau a unui fragment al acestuia de legare a antigenului, conform prezentei invenții, cuprinzând administrarea unei probe, care include anticorpul sau fragmentul, într-un mediu de purificare (de exemplu, un mediu cu schimb de cationi, un mediu cu schimb de anioni, un mediu cu schimb hidrofob, un mediu de purificare a afinității (de exemplu, proteina A, proteina G, proteina A/G, proteina L)) și fie colectarea anticorpului purificat sau a fragmentului din fracțiunea filtratului respectivei probe care nu se leagă la mediu; fie eliminarea fracțiunii filtratului și eluarea anticorpului sau a fragmentului legat din acest mediu și colectarea eluatului. Într-o variantă de realizare a invenției, mediul se află într-o coloană pe care se aplică proba. Într-o variantă de realizare, procedeul de purificare se efectuează după exprimarea recombinantă a anticorpului sau a fragmentului în celula gazdă, de exemplu, caracterizat prin aceea că celula gazdă este mai întâi lizată și apoi, în mod opțional, lizatul este purificat de materialele insolubile înainte de purificarea sa pe un mediu.

De regulă, glicoproteinele, produse într-o anumită linie celulară sau un animal transgenic, posedă un model de glicozilare caracteristic pentru glicoproteinele produse în linia celulară sau animalul transgenic. Prin urmare, modelul specific de glicozilare a unui anticorp depinde de linia celulară particulară sau de animalul transgenic folosit pentru producerea anticorpului. Totuși, toți anticorpii codificați de moleculele de acid nucleic, prezentate în documentul de față sau cuprinzând secvențele de aminoacizi prezentate în documentul de față, fac parte din prezenta invenție, independent de modelul de glicozilare pe care îl pot avea anticorpii. În mod similar, în unele variante particulare de realizare, anticorpii cu un model de glicozilare cuprinzând doar N-

glicani non-fucozilați pot oferi avantaje, deoarece s-a dovedit că acești anticorpi prezintă, de regulă, o eficacitate mai mare decât omologii lor fucozilați atât *in vitro*, cât și *in vivo* (Shinkawa et al. J. Biol. Chem., no 278, 2003, p. 3466-3473; US 6946292; US 7214775). Acești anticorpi cu N-glicani non-fucozilați nu sunt susceptibili de a fi imunogeni, deoarece structurile lor de

5 carbohidrați constituie o componentă normală a populației care există în IgG din serul uman.

Prezenta invenție se referă la anticorpii policlonali anti-TIGIT și la fragmentele acestora de legare a antigenului, de exemplu, la o compoziție care cuprinde o multitudine de anticorpi anti-TIGIT și fragmente conținând unul sau mai mulți anticorpi anti-TIGIT sau fragmente ale acestora de legare a antigenului, conform prezentei invenții, și la procedeele de utilizare a lor. Un anticorp policlonal este un anticorp care a fost obținut împreună cu unul sau cu câțiva alți anticorpi neidentici sau în prezența lor. De regulă, anticorpii policlonali sunt obținuți din colecții de diferite limfocite B, de exemplu, din limfocite B ale unui animal, tratat cu un imunogen care prezintă interes, producând o populație de diferiți anticorpi, dar care cu toții sunt orientați împotriva imunogenului. De regulă, anticorpii policlonali sunt obținuți direct de la un animal imunizat, de exemplu, din splină, ser sau lichid de ascită.

Prezenta invenție se referă la anticorpii bifuncționali și bispecfici și la fragmentele de legare a antigenului având specificitate de legare pentru TIGIT și pentru un alt antigen, cum ar fi, de exemplu, PD-1 sau PD-L1, sau LAG-3, și la procedeele de utilizare a acestora. Într-un exemplu de realizare a invenției, lanțurile anti-TIGIT conțin oricare dintre secvențele  $V_H/V_L$ , descrise în Tabelul 4, iar lanțurile PD1 conțin secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 33 și 34 sau din SECV. ID NR. 35 și 36 (sau un fragment de legare a antigenului conform oricăreia dintre secvențele menționate mai sus). Un anticorp bifuncțional sau bispecific constituie un anticorp hibrid artificial având două perechi diferite de lanțuri grele/lanțuri ușoare și două situsuri diferite de legare. Anticorpii bispecfici pot fi obținuți printr-o varietate de procedee, inclusiv prin fuziunea hibridoamelor sau prin legarea fragmentelor Fab' (Songsivilai et al. Clin. Exp. Immunol., no 79, 1990, p. 315-321; Kostelny et al. J. Immunol., no 148, 1992, p. 1547-1553). Totodată, anticorpii bispecfici pot fi formați ca „diacorpi” (Holliger et al. PNAS USA, no 90, 1993, p. 6444-6448) sau ca „janusins” (Traunecker et al. EMBO J., no 10, 1991, p. 3655-3659; Traunecker et al. Int. J. Cancer Suppl., no 7, 1992, p. 51-52).

În afară de aceasta, prezenta invenție se referă, de asemenea, la fragmente anti-TIGIT de legare a antigenului ale anticorpilor anti-TIGIT, dezvăluți în documentul de față. Fragmentele anticorpilor includ fragmente  $F(ab)_2$ , care pot fi obținute prin scindarea enzimatică a unei IgG, de exemplu, cu ajutorul pepsinei. Fragmentele Fab pot fi obținute, de exemplu, prin reducerea  $F(ab)_2$  cu ditiotreititol sau mercaptoetilamină.

Imunoglobulinele pot fi atribuite unor clase diferite, în funcție de secvențele de aminoacizi ale domeniului constant al lanțurilor lor grele. Există cel puțin cinci clase principale de imunoglobuline: IgA, IgD, IgE, IgG și IgM și câteva dintre acestea pot fi divizate mai departe în subclase (izotipuri), de exemplu, IgG1, IgG2, IgG3 și IgG4; IgA1 și IgA2. Invenția în cauză se referă la anticorpi și la fragmente ale acestora de legare a antigenului din oricare dintre aceste clase sau subclase.

Intr-o variantă de realizare, anticorpul sau fragmentul de legare a antigenului cuprinde o regiune constantă a lanțului greu, de exemplu, o regiune constantă umană, precum regiunea constantă a lanțului greu  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ ,  $\gamma 3$ , sau  $\gamma 4$  uman ori o variantă a acesteia. Intr-o altă variantă de realizare, anticorpul sau fragmentul de legare a antigenului cuprinde o regiune constantă a lanțului ușor, de exemplu, regiunea constantă a lanțului ușor uman, cum ar fi regiunea lanțului ușor lambda sau kappa uman sau o variantă a acesteia. Cu titlu de exemplu, însă fără limitare la acesta, regiunea constantă a lanțului greu uman poate prezenta  $\gamma 4$  și regiunea constantă a lanțului ușor uman poate prezenta kappa. Într-o variantă alternativă de realizare, regiunea Fc a anticorpului constituie  $\gamma 4$  cu o mutație Ser228Pro (Schoorman, J. și colab. Mol. Immunol., no 38, 2001, p. 1-8).

Intr-o variantă de realizare, anticorpul sau fragmentul de legare a antigenului cuprinde regiunea constantă a lanțului greu al subtipului IgG1.

In unele exemple de realizare, diverse domenii constante pot fi alipite la regiunile  $V_H$  și  $V_L$  umanizate, obținute din CDR-urile prezentate în invenția de față. De exemplu, dacă o anumită utilizare preconizată a unui anticorp (sau fragment), conform prezentei invenții, necesită funcții efectoare modificate, poate fi utilizat un domeniu constant al lanțului greu, altul decât IgG1 uman, sau pot fi utilizat hibridul IgG1/IgG4.

Cu toate că anticorpii umani IgG1 asigură o perioadă lungă de înjumătățire și funcții efectoare, cum ar fi activarea complementului și citotoxicitatea celulară dependentă de anticorp,

astfel de activități pot fi nedorite pentru toate modurile de utilizare ale anticorpului. În astfel de cazuri, poate fi utilizat, de exemplu, domeniul constant al IgG4 uman. Prezenta invenție se referă la anticorpii anti-TIGIT și la fragmentele acestora de legare a antigenului cuprinzând domeniul constant IgG4, de exemplu, la anticorpii antagoniști umanizați anti-TIGIT și la fragmentele acestora, și la procedeele de utilizare a lor. Intr-o variantă de realizare, domeniul constant IgG4 poate să difere de domeniul constant IgG4 uman nativ (Swiss-Prot Accession Nr. P01861.1) în poziția corespunzătoare poziției 228 din sistemul UE și poziției 241 din sistemul KABAT, caracterizat prin aceea că Ser108 nativ este înlocuit cu Pro pentru a preveni o potențială legătură disulfidică intercatenară dintre Cys 106 și Cys 109 (care corespund pozițiilor Cys 226 și Cys 229 din sistemul UE și pozițiilor Cys 239 și Cys 242 din sistemul KABAT), care poate afecta formarea legăturii disulfidice intracatenare corecte (Angal et al. Mol. Immunol., no 30, 1993, p. 105). În alte cazuri, poate fi utilizat domeniul constant IgG1 modificat cu scopul de a crește timpul de înjumătățire sau de reducere a funcției efectoare.

#### 15 Ingineria anticorpilor

În continuare, sunt incluse variante de realizare în care anticorpii anti-TIGIT și fragmentele acestora de legare a antigenului prezintă anticorpi construiți pentru a include modificări în resturile cadru din interiorul domeniilor variabile ale unui anticorp monoclonal parental (de exemplu, de șoarece sau de șobolan), de exemplu, pentru a îmbunătăți proprietățile anticorpului sau ale fragmentului. În mod tipic, aceste modificări ale cadrului sunt efectuate pentru a reduce imunogenitatea anticorpului sau fragmentului. Acest lucru este realizat, de regulă, prin înlocuirea resturilor care nu se referă la CDR-urile din domeniile variabile (și anume, ale resturilor cadru) într-un anticorp parental (de exemplu, de rozătoare) sau într-un fragment cu resturi similare din repertoriul imun al speciilor, în care urmează să fie utilizat anticorpul, de exemplu, resturi umane în cazul unui remediu terapeutic pentru un subiect uman. Un astfel de anticorp sau fragment este desemnat ca un anticorp sau fragment „umanizat”. În unele cazuri, este de dorit să fie mărită afinitatea sau să fie modificată specificitatea unui anticorp creat (de exemplu, unui anticorp umanizat). Unul dintre procedee constă în „mutageneza inversă” a unui sau a mai multor resturi cadru până la secvența liniei germinale corespunzătoare. Mai concret, un anticorp sau un fragment care a fost supus unei mutații somatice poate conține resturi cadru care diferă de secvența liniei germinale din care este derivat anticorpul. Aceste resturi pot fi identificate prin compararea secvențelor cadru ale anticorpului sau fragmentului cu secvențele liniei germinale din care provine anticorpul sau fragmentul. Un alt procedeu constă în revenirea la restul inițial parental (de exemplu, care provine de la rozătoare) în una sau în mai multe poziții ale anticorpului construit (de exemplu, umanizat), de exemplu, pentru a restabili afinitatea de legare care poate fi pierdută în procesul de înlocuire a resturilor cadru (US 5693762; US 5585089; US 5530101).

În anumite exemple de realizare, anticorpii anti-TIGIT și fragmentele acestora de legare a antigenului sunt construite (de exemplu, umanizate) pentru a include modificări în structură și/sau CDR-uri cu scopul de a îmbunătăți proprietățile acestora. Astfel de modificări create pot fi operate în baza modelării moleculare. Un model molecular al regiunii variabile pentru secvența parentală (non-umană) a anticorpului poate fi construit pentru înțelegerea caracteristicilor structurale ale anticorpului și utilizat pentru a identifica potențialele regiuni ale anticorpului care pot interacționa cu antigenul. CDR-urile convenționale se bazează pe aliniamentul secvențelor de imunoglobulină și identificarea regiunilor variabile (Kabat et al. National Institutes of Health, Bethesda, Md.; 5th ed.; NIH Publ. No. 91-3242, 1991; Kabat et al. Adv. Prot. Chem., no 32, 1978, p. 1-75; Kabat et al. J. Biol. Chem., no 252, 1977, p. 6609-6616). Chothia și colaboratorii au examinat minuțios conformațiile buclelor în structurile cristaline ale anticorpilor și au propus bucle hipervariabile (Chothia et al. J. Mol. Biol., no 196, 1987, p. 901-917; Chothia et al. Nature, no 342, 1989, p. 878-883). Există deosebiri între regiuni, clasificate ca „CDR-uri” și „bucle hipervariabile”. În studiile ulterioare (Raghunathan et al. J. Mol. Recog., vol 25, no 3, 2012, p. 103-113) au fost analizate mai multe complexe cristaline de anticorp-antigen și a fost depistat faptul că regiunile de legare a antigenului din anticorpi nu sunt neapărat strict conforme resturilor „CDR” sau buclelor „hypervariable”. Modelul molecular pentru regiunea variabilă a anticorpului non-uman poate fi utilizat în calitate de instrucțiune pentru procesul de selectare a regiunilor care în mod potențial se pot lega la antigen. În practică, regiunile potențiale de legare la antigen, bazate pe model, diferă de buclele „CDR” sau „hipervariabile” convenționale. Pentru modelarea moleculară poate fi utilizat software științific comercial, precum este MOE (Chemical Computing Group). Regiunile cadru umane pot fi selectate pe baza celor mai bune

coincidențe cu secvența non-umană, atât în regiunile cadru, cât și în CDR-uri. Pentru FR4 (regiunea cadru 4) din VH, regiunile VJ din liniile germinale umane sunt comparate cu regiunea non-umană corespunzătoare. În cazul FR4 (regiunea cadru 4) din VL, regiunile J-kappa și J-lambda ale secvențelor liniei germinale umane sunt comparate cu regiunea non-umană corespunzătoare. După identificarea regiunilor cadru umane adecvate, CDR-urile sunt grefate în regiunile cadru umane selectate. În unele cazuri, anumite resturi de pe suprafața segmentului VL-VH pot fi conservate așa cum sunt ele în secvența non-umană (parentală). Modelele moleculare pot fi, de asemenea, utilizate pentru identificarea resturilor care pot modifica în mod potențial conformațiile CDR și, astfel, legarea la antigen. În unele cazuri, aceste resturi sunt conservate ca în secvența neumană (parentală). Modelele moleculare pot fi, de asemenea, folosite pentru identificarea aminoacizilor expuși solventului care pot conduce la efecte nedorite, cum ar fi glicozilarea, dezamidarea și oxidarea. Filtrele de dezvoltare pot fi introduse din timp, în faza de proiectare, pentru eliminarea/minimizarea acestor posibile probleme.

Un alt tip de modificare a cadrului presupune mutageneza unui sau a mai multor resturi din regiunea cadru, sau chiar în una sau mai multe regiuni CDR, pentru a elimina epitopii celulelor T și pentru a reduce astfel potențiala imunogenitate a anticorpului. Acest procedeu este denumit, de asemenea, ca „deimunizare” (US 7125689).

În unele exemple particulare de realizare, este de dorit ca anumiți aminoacizi conținând lanțuri laterale expuse să fie înlocuiți cu un alt rest de aminoacid, pentru a asigura o stabilitate chimică mai mare a anticorpului final, astfel încât deamidarea sau izomerizarea să fie evitate. Deamidarea asparaginei poate avea loc în secvențele NG, DG, NG, NS, NA, NT, QG sau QS și au ca rezultat formarea unui rest de acid izoaspartic care introduce o inflexiune în lanțul polipeptidic și scade stabilitatea acestuia (efectul acidului izoaspartic). Izomerizarea poate avea loc în secvențele DG, DS, DA sau DT. În anumite exemple de realizare, anticorpii conform prezentei invenții nu conțin sitesuri de deamidare sau izomerizare a asparaginei.

De exemplu, restul de asparagină (Asn) poate fi substituit cu Gin sau Ala pentru a reduce potențialul de formare a izoaspartatului în oricare dintre secvențele Asn-Gly, în special, în interiorul CDR. O problemă similară poate apărea la secvența Asp-Gly (Reissner and Aswad. Cell. Mol. Life Sci., no 60, 2003, p. 1281). Formarea izoaspartatului poate slăbi sau suprima complet legarea anticorpului la antigenul țintă (Presta. J. Allergy Clin. Immunol., no 116, 2005, p. 731-734). Într-o variantă de realizare, asparagina este substituită cu glutamină (Gln). Poate fi, de asemenea, de dorit să fie modificat aminoacidul adiacent unui rest de asparagină (Asn) sau de glutamină (Gln) pentru a reduce probabilitatea dezamidării care are loc cu o frecvență mai mare atunci când aminoacizii mici nimeresc în vecinătatea asparaginei sau glutaminei (Bischoff & Kolbe. J. Chromatog., no 662, 1994, p. 261). În afară de aceasta, toate resturile de metionină (de regulă, expusă solventului Met) din CDR-uri pot fi înlocuite cu Lys, Leu, Ala sau Phe, sau cu alți aminoacizi în scopul reducerii probabilității de oxidare a sulfului din metionină, ceea ce ar putea reduce afinitatea de legare cu antigenul și, de asemenea, ar putea contribui la eterogenitatea moleculară în preparatul final al anticorpului, *Id.* Totodată, pentru a preveni sau minimiza potențialul clivaj al legăturilor peptidice Asn-Pro, poate fi dezirabil să fie substituite orice combinații Asn-Pro, depistate în CDR, cu Gln-Pro, Ala-Pro sau Asn-Ala. Ulterior, anticorpii cu astfel de substituții sunt supuși analizei pentru a se asigura că substituțiile nu scad afinitatea sau specificitatea anticorpului în raport cu TIGIT sau o altă activitate biologică preconizată până la niveluri inacceptabile.

Variante de stabilizare CDR cu titlu de exemple

Tabelul 2

| Resturi CDR                               | Variante de stabilizare a secvenței                    |
|-------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| Asn-Gly<br>(N-G)                          | Gln-Gly, Ala-Gly sau Asn-Ala<br>(Q-G), (A-G) sau (N-A) |
| Asp-Gly<br>(D-G)                          | Glu-Gly, Ala-Gly sau Asp-Ala<br>(E-G), (A-G) sau (D-A) |
| Met (de regulă, expus solventului)<br>(M) | Lys, Leu, Ala sau Phe<br>(K), (L), (A) sau (F)         |
| Asn<br>(N)                                | Gln sau Ala<br>(Q) sau (A)                             |
| Asn-Pro<br>(N-P)                          | Gln-Pro, Ala-Pro sau Asn-Ala<br>(Q-P), (A-P) sau (N-A) |

În unele variante de realizare a prezentei invenții, CDR3 din SECV. ID NR. 3 poate fi modificată la poziția 110W pentru a reduce sau elimina o potențială oxidare (în care numerotarea corespunde cu Kabat). Astfel, de exemplu, SECV. ID NR. 3 (MPSFITLASLSTWEGYFDF) poate fi modificată până la oricare dintre următoarele secvențe: MPSFITLASLSTFEGYFDF (SECV. ID NR. 79), MPSFITLASLSTYEGYFDF (SECV. ID NR. 80), MPSFITLASLSTIEGYFDF (SECV. ID NR. 81), MPSFITLASLSTVEGYFDF (SECV. ID NR. 82) sau MPSFITLASLSTLEGYFDF (SECV. ID NR. 83). Astfel, în unele exemple de realizare a prezentei invenții, anticorpul anti-TIGIT conform invenției cuprinde regiunea variabilă a lanțului greu cuprinzând CDR1 din SECV. ID NR. 1, CDR2 din SECV. ID NR. 2 și CDR3 din SECV. ID NR. 3, 79, 80, 81, 82 sau 83.

În unele variante de realizare a prezentei invenții, CDR2 din SECV. ID NR. 5 poate fi modificată în pozițiile 52N și 53S pentru a reduce sau a elimina potențialele sitesuri de dezamidare (în care numerotarea este conformă cu Kabat). Astfel, de exemplu, SECV. ID NR. 5 (YANSLQT) poate fi modificată până la oricare dintre următoarele secvențe: YASNLQT (SECV. ID NR. 65), YASSLQT (SECV. ID NR. 66), YASTLQT (SECV. ID NR. 67), YATTLQT (SECV. ID NR. 68), YASYLQT (SECV. ID NR. 69), YANQLQT (SECV. ID NR. 70), YAGSLQT (SECV. ID NR. 71), YASQLQT (SECV. ID NR. 72), YADSLQT (SECV. ID NR. 73). Astfel, în unele exemple de realizare a prezentei invenții, anticorpul anti-TIGIT conform invenției de față conține o regiune variabilă a lanțului ușor care cuprinde CDR1 din SECV. ID NR. 4, CDR2 din SECV. ID NR. 5, SECV. ID NR. 66, SECV. ID NR. 67, SECV. ID NR. 68, SECV. ID NR. 69, SECV. ID NR. 70, SECV. ID NR. 71, SECV. ID NR. 72 sau SECV. ID NR. 73, și CDR3 din SECV. ID NR. 6.

În unele exemple de realizare a prezentei invenții, CDR3 din SECV. ID NR. 6 poate fi modificată la poziția 95W pentru a reduce sau a elimina o potențială oxidare (în care numerotarea este conformă metodei Kabat). Astfel, de exemplu, SECV. ID NR. 6 (QQYYSGWT) poate fi modificată până la oricare dintre următoarele secvențe: QQYYSGFT (SECV. ID NR. 74), QQYYSGYT (SECV. ID NR. 75), QQYYSGIT (SECV. ID NR. 76), QQYYSGVT (SECV. ID NR. 77), QQYYSGLT (SECV. ID NR. 78). Astfel, în unele exemple de realizare a prezentei invenții, anticorpul anti-TIGIT conform invenției conține o regiune variabilă a lanțului ușor care cuprinde CDR1 din SECV. ID NR. 4, CDR2 din SECV. ID NR. 5 și CDR3 din SECV. ID NR. 6, SECV. ID NR. 74, SECV. ID NR. 75, SECV. ID NR. 76, SECV. ID NR. 77 sau SECV. ID NR. 78.

În unele variante de realizare a prezentei invenții, anticorpul anti-TIGIT conform invenției conține regiunea variabilă a lanțului ușor care cuprinde CDR1 din SECV. ID NR. 4, CDR2 din SECV. ID NR. 5, SECV. ID NR. 66, SECV. ID NR. 67, SECV. ID NR. 68, SECV. ID NR. 69, SECV. ID NR. 70, SECV. ID NR. 71, SECV. ID NR. 72 sau SECV. ID NR. 73, și CDR3 din SECV. ID NR. 6, SECV. ID NR. 74, SECV. ID NR. 75, SECV. ID NR. 76, SECV. ID NR. 77 sau SECV. ID NR. 78.

Intr-o altă variantă de realizare a prezentei invenții, anticorpul anti-TIGIT conform invenției conține regiunea FR4 a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi din oricare dintre SECV. ID NR. 7, 9-24 sau 38-47, caracterizat prin aceea că M din poziția 122 este substituit cu V, L, A, R, N, P, Q, E, G, I, H, K, F, S, T, W sau L pentru a evita o posibilă oxidare.

Intr-o altă formă de realizare a prezentei invenții, anticorpul anti-TIGIT conform invenției cuprinde regiunea FR4 a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi din oricare dintre SECV. ID NR. 7, 9-24 sau 38-47, caracterizat prin aceea că M din poziția 122 și V din poziția 123 sunt substituite cu T și, respectiv, L, pentru a evita o potențială oxidare.

În unele exemple de realizare a prezentei invenții, CDR3 din SECV. ID NR. 90 poate fi modificată în poziția 6 pentru a reduce sau a elimina o potențială oxidare. Astfel, de exemplu, SECV. ID NR. 90 (GGPYGWYFDV) poate fi modificată până la oricare dintre următoarele secvențe: SECV. ID NR. 154-167.

#### Ingineria regiunii Fc a anticorpului

Anticorpuri (de exemplu, anticorpuri umanizate) și fragmentele acestora de legare a antigenului, descriși în prezentul document (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 și versiunile umanizate ale acestora), pot fi, de asemenea, construite astfel pentru a include modificările în regiunea Fc, de regulă, pentru a modifica una sau mai multe proprietăți ale anticorpului, cum ar fi timpul de înjumătățire în ser, fixarea complementului, legarea cu receptorul Fc și/sau funcția efectoare (de exemplu, citotoxicitatea celulară dependentă de antigen). Mai mult ca atât, anticorpuri și fragmentele acestora de legare a antigenului, devăluți în prezenta invenție (de

exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 și versiunile umanizate ale acestora), pot fi modificați din punct de vedere chimic (de exemplu, una sau mai multe fragmente chimice pot fi unite la anticorp) sau pot fi modificați pentru a le schimba glicozilarea, precum și pentru a modifica una sau mai multe proprietăți ale anticorpului sau ale fragmentului. Fiecare dintre aceste exemple de realizare este descris în detaliu în continuare. Numerotarea resturilor din regiunea Fc este conformă cu cea din indicele UE după Kabat.

Anticorpul și fragmentele acestora de legare a antigenului descriși în documentul de față (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 și versiunile umanizate ale acestora), includ, de asemenea, anticorpul și fragmentele cu regiunile Fc modificate (sau blocate) pentru a asigura funcții efectoare modificate. (US 5624821; WO2003/086310; WO2005/120571; WO2006/0057702). Astfel de modificări pot fi folosite pentru a spori sau suprima diferite reacții ale sistemului imunitar, cu posibile efecte benefice pentru diagnostic și terapie. Modificările din regiunile Fc includ modificări ale aminoacizilor (substituții, deleții și inserții), glicozilarea sau deglicozilarea și adăugarea mai multor regiuni Fc. Modificările aduse regiunii Fc pot schimba, de asemenea, timpul de înjumătățire a anticorpilor în anticorpul terapeutic, ceea ce permite o dozare mai puțin frecventă și, astfel, o comoditate mai mare și o utilizare mai redusă a materialului (Presta. J. Allergy Clin. Immunol., no 116, 2005, p. 731-734).

Intr-o variantă de realizare, anticorpul sau fragment acestuia de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 sau versiunile umanizate ale acestora), prezintă un anticorp sau un fragment al izotipului IgG4 care cuprinde o mutație a serinei până la prolină într-o poziție corespunzătoare poziției 228 (S228P; indicele UE) în regiunea balama a regiunii constante a lanțului greu. A fost publicată informația privind faptul că această mutație elimină eterogenitatea punților disulfidice dintre lanțurile grele în regiunea balama ((Angal et al. Mol. Immunol., no 30, 1993, p. 105) poziția 241 în baza sistemului de numerotare Kabat).

Intr-o variantă de realizare a invenției, regiunea balama a CH1 este modificată astfel, încât numărul resturilor de cisteină din regiunea balama crește sau scade. Acest procedeu este descris suplimentar în brevetul US nr. 5677425. Numărul resturilor de cisteină din regiunea balama a CH1 este modificat, de exemplu, pentru a facilita asamblarea lanțurilor ușoare și grele sau pentru a mări sau micșora stabilitatea anticorpului.

Intr-o altă variantă de realizare, regiunea balama Fc a unui anticorp sau fragment de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6, 28H5 sau 31C6 sau versiunile umanizate ale acestora), este supusă mutagenzei pentru a reduce timpul biologic de înjumătățire a anticorpului sau fragmentului. Mai precis, una sau mai multe mutații de aminoacizi sunt introduse pe suprafața de contact CH2-CH3 a domeniului fragmentului Fc-balama astfel, încât anticorpul sau fragmentul posedă o deficiență de legare a proteinei stafilococice A (SpA) în raport cu legarea SpA de către domeniul Fc-balama nativ. Acest procedeu este descris în detaliu în brevetul US nr. 6165745.

Intr-o altă variantă de realizare, anticorpul sau fragmentul de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6 sau 28H5, sau o versiune umanizată a acestora), este modificat pentru a crește timpul său biologic de înjumătățire. Sunt posibile diverse procedee. De exemplu, pot fi introduse una sau mai multe dintre următoarele mutații: T252L, T254S, T256F (US 6277375). Ca alternativă, pentru a crește timpul biologic de înjumătățire, anticorpul poate fi modificat în interiorul regiunii CH1 sau CL ca să conțină un epitop de legare la receptorul recuperatoriu, luat din două bucle ale domeniului CH2 al regiunii Fc a IgG (US 5869046; US 6121022).

În alte variante de realizare, regiunea Fc este modificată prin înlocuirea a cel puțin unui rest de aminoacid cu un rest de aminoacid diferit pentru a modifica funcția (funcțiile) efectoare ale anticorpului sau fragmentului de legare a antigenului. De exemplu, unul sau mai mulți aminoacizi, selectați dintre resturile de aminoacizi 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 și 322 pot fi înlocuiți cu un alt rest de aminoacid, astfel încât anticorpul să aibă o afinitate modificată pentru un ligand efector și să păstreze capacitatea de legare la antigen a anticorpului parental. Ligandul efector, afinitatea cărui este modificată, poate prezenta, de exemplu, un receptor Fc sau o componentă a complementului C1 (US 5624821; US 5648260).

Intr-un alt exemplu de realizare, unul sau mai mulți aminoacizi, selectați dintre resturile de aminoacizi 329, 331 și 322, pot fi substituiți cu un alt rest de aminoacid, astfel încât anticorpul să posede o afinitate modificată a C1q și/sau o citotoxicitate dependentă de complement (CDC) redusă sau pierdută (US 6194551).

Intr-un alt exemplu de realizare, unul sau mai multe resturi de aminoacizi din pozițiile 231 și 239 ale aminoacizilor sunt modificate pentru a schimba astfel capacitatea anticorpului de a fixa complementul (WO 94/29351).

5        Încă într-un exemplu de realizare, regiunea Fc este modificată pentru a reduce capacitatea anticorpului sau fragmentului de legare a antigenului conform invenției (de exemplu, 14A6 sau 28H5, sau o versiune umanizată a acestora) de a media citotoxicitatea celulară dependentă de anticorp (CCDA) și/sau de a scădea afinitatea anticorpului sau a fragmentului pentru un receptor Fcγ prin modificarea unuia sau a mai multor aminoacizi din următoarele poziții: 238, 239, 243, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 264, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 10        286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 sau 439. Acest procedeu este descris suplimentar în publicația PCT WO 00/42072. Mai mult decât atât, au fost cartografiate situsurile de legare la IgG1 umană pentru FcγRI, FcγRII, FcγRIII și FcRn, fiind descrise variante cu legare 15        îmbunătățită (Shields et al. J. Biol. Chem., no 276, 2001, p. 6591-6604).

Intr-un exemplu de realizare a invenției, regiunea Fc este modificată pentru a reduce capacitatea anticorpilor conform invenției (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 și versiunile umanizate ale acestora) de a media funcția efectoare și/sau de a spori proprietățile anti-inflamatorii prin intermediul modificării resturilor 243 și 264. Într-o variantă de realizare, 20        regiunea Fc a anticorpului sau a fragmentului este modificată prin substituirea resturilor din pozițiile 243 și 264 cu alanină. Într-o altă variantă de realizare, regiunea Fc este modificată pentru a reduce capacitatea anticorpului sau a fragmentului de a media funcția efectoare și/sau de a spori proprietățile anti-inflamatorii prin modificarea resturilor 243, 264, 267 și 328.

#### 25        Fortificarea funcției efectoare

In unele variante de realizare, regiunea Fc a unui anticorp anti-TIGIT este modificată pentru a spori capacitatea anticorpului sau fragmentului de legare a antigenului de a media funcția efectoare și/sau de a fortifica legarea lor la receptorii Fc-gamma (FcγRs).

30        Termenul „funcție efectoare”, așa cum este utilizat în invenția solicitată, este destinat pentru a desemna una sau mai multe dintre următoarele activități: activitatea citotoxică mediată de celulele anticorp-dependente (ADCC), răspunsurile mediate de activitatea citotoxică complement-dependantă (CDC), fagocitoza Fc-mediată sau fagocitoza celulară anticorp-dependantă (ADCP) și reciclarea anticorpilor prin intermediul receptorului FcRn.

35        Se estimează că interacțiunea dintre regiunea constantă a unei proteine de legare a antigenului și diferiți receptori Fc (FcR) incluzând Fc-gammaRI (CD64), Fc-gammaRII (CD32) și Fc-gammaRIII (CD 16), mediază funcțiile efectoare, cum ar fi ADCC și CDC, ale proteinei de legare a antigenului. Receptorul Fc este, de asemenea, important pentru legarea încrucișată a anticorpului și poate fi semnificativ pentru imunitatea antitumorală.

40        Funcția efectoare poate fi măsurată prin mai multe modalități, inclusiv, de exemplu, prin legarea Fc-gammaRIII cu celulele Natural Killer sau prin legarea Fc-gammaRI cu monocite/macrofage pentru a măsura funcția efectoare a ADCC. De exemplu, o proteină de legare a antigenului, conform prezentei invenții, poate fi evaluată după funcția efectoare a ADCC într-un test de celule Natural Killer. Exemple de astfel de teste pot fi găsite în literatura de specialitate (Shields et al. J. Biol. Chem., no 276, 2001, p. 6591-6604; Chappel et al. J. Biol. 45        Chem., vol. 268, 1993, p. 25124-25131; Lazar et al. PNAS, no 103, 2006, p. 4005-4010).

Proprietățile ADCC sau CDC ale anticorpilor, conform prezentei invenții, sau proprietățile lor de legare încrucișată pot fi fortificate prin mai multe procedee.

Pentru regiunile constante ale IgG1 umane care posedă mutații specifice sau glicozilare modificată pe restul Asn297 a fost demonstrată o legare mărită cu receptorii Fc. În unele cazuri, 50        s-a demonstrat, de asemenea, că aceste mutații sporesc ADCC și CDC (Shields et al. J. Biol. Chem., no 276, 2001, p. 6591-6604; Lazar et al. PNAS, no 103, 2006, p. 4005-4010; Nechansky et al. Mol. Immunol., no 44, 2007, p. 1815-1817).

Intr-o variantă de realizare a prezentei invenții, astfel de mutații sunt prezente în una sau mai multe din pozițiile, selectate din 239, 332 și 330 (IgG1) sau în pozițiile echivalente din alte izotipuri de IgG. Exemple de mutații adecvate prezintă S239D, I332E și A330L. Într-o variantă 55        de realizare, proteina de legare a antigenului, conform invenției, descrisă în documentul de față, este supusă mutagenzei în pozițiile 239 și 332, de exemplu, S239D și I332E sau, într-o altă variantă de realizare, este supusă mutagenzei în trei sau mai multe poziții, selectate dintre 239, 332 și 330, de exemplu, S239D și I332E, și A330L. (Numerotare conformă indicelui UE).

Intr-o variantă alternativă de realizare a prezentei invenții, a fost prezentat un anticorp care cuprinde o regiune constantă a lanțului greu cu un profil de glicozilare modificat, astfel încât proteina de legare a antigenului posedă o funcție efectorie fortificată. De exemplu, caracterizată prin aceea că anticorpul posedă o ADCC îmbunătățită sau CDC îmbunătățită, sau

5 că el posedă funcții efectorie îmbunătățite atât ADCC, cât și CDC. Exemple de procedee adecvate de obținere a proteinei de legare a antigenului cu un profil modificat de glicozilare sunt descrise în literatura brevetară (WO 2003/011878; WO 2006/014679; EP 1229125).

Intr-un alt aspect al său, prezenta invenție se referă la anticorpi „non-fucozilați” sau „afucozilați”. Anticorpii non-fucozilați conțin o structură nucleică tri-manozil de N-glicani de tip

10 complex Fc fără resturi de fucoză. Acești anticorpi glico-modificați, care sunt lipsiți de restul nucleic de fucoză din N-glicanii Fc, pot avea o ADCC mai puternică decât echivalentele lor fucozilate, datorită sporirii capacității de legare a Fc-gammaRIII.

Prezenta invenție se referă, de asemenea, la un procedeu de producere a unui anticorp conform invenției, care cuprinde următoarele etape de: a) cultivare a unei celule gazdă recombinantă cuprinzând un vector de expresie care conține un acid nucleic izolat, așa cum este

15 descris în documentul de față, caracterizat prin aceea că celula gazdă recombinantă nu cuprinde o alfa-1,6-fucoziltransferază; și b) izolarea proteinei de legare a antigenului. În mod normal, celula gazdă recombinantă poate să nu conțină o genă care codifică o alfa-1,6-fucoziltransferază (de exemplu, celulele gazdă de drojdie, cum ar fi *Pichia sp.*) sau poate fi modificată genetic pentru

20 inactivarea unei alfa-1,6-fucoziltransferază. Sunt disponibile celule gazdă recombinante modificate genetic pentru inactivarea genei FUT8 codificand o alfa-1,6-fucoziltransferază. A se vedea, de exemplu, sistemul tehnologic POTELLIGENT™ disponibil de la BioWa, Inc. (Princeton, N.J.), în care celulele CHOK1SV, lipsite de o copie funcțională a genei FUT8, produc anticorpi monoclonali având o activitate sporită de citotoxicitate cu mediere celulară

25 anticorp-dependentă (ADCC) în raport cu un anticorp monoclonal identic, produs într-o celulă cu gena funcțională FUT8. Aspectele sistemului tehnologic POTELLIGENT™ sunt descrise în literatura de specialitate (US 7214775; US 6946292; WO 0061739; WO 0231240). Specialiștii din domeniul de referință vor recunoaște, de asemenea, și alte sisteme adecvate.

Pentru specialiștii în domeniul de referință va fi evident faptul că astfel de modificări pot

30 fi utilizate nu doar în monoterapie, ci pot fi aplicate și în combinație unele cu altele, cu scopul de a fortifica și mai mult funcția efectorie.

#### Obținerea anticorpilor cu glicozilare modificată

Intr-o altă variantă de realizare, anticorpii sau fragmentele acestora de legare a

35 antigenului, conform prezentei invenții (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 și versiunile umanizate ale acestora), cuprind un anumit model de glicozilare. De exemplu, se poate obține un anticorp afucozilat sau un anticorp aglicozilat sau un fragment (și anume, un anticorp lipsit de fucoză sau de glicozilare, respectiv). Modelul de glicozilare al unui anticorp sau al unui fragment poate fi

40 modificat, de exemplu, pentru a spori afinitatea sau aviditatea anticorpului sau a fragmentului pentru un antigen TIGIT. Astfel de modificări pot fi realizate, de exemplu, prin modificarea unuia sau a mai multor situsuri de glicozilare în secvența anticorpului sau a fragmentului. De exemplu, pot fi efectuate una sau mai multe substituții de aminoacizi care conduc la eliminarea unuia sau a mai multor situsuri de glicozilare din cadrul regiunii variabile pentru a elimina astfel glicozilarea în acest situs. O astfel de aglicozilare poate crește afinitatea sau aviditatea anticorpului sau a

45 fragmentului în raport cu antigenul (US 5714350; US 6350861).

Anticorpii și fragmentele acestora de legare a antigenului, dezvăluiți în invenția propusă (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 și versiunile umanizate ale acestora, pot include suplimentar anticorpii și fragmentele produși în celulele gazdă ale eucariotelor inferioare, în special în

50 celulele gazdă fungice, cum ar fi drojdia și fungiile filamentoase, modificate genetic pentru a produce glicoproteine posedand modele de glicozilare similare modelelor de glicozilare de mamifer sau uman (Choi et al. Proc. Natl. Acad. Sci., no 100, 2003, p. 5022-5027; Hamilton et al. Science, no 301, 2003, p.1244-1246; Hamilton et al. Science, no 313, 2006, p. 1441-1443; Nett et al, Yeast, no 28(3), 2011, p. 237-52; Hamilton et al. Curr. Opin. Biotechnol. Oct, vol 18(5), 2007, p. 387-392). Un avantaj deosebit al acestor celule gazdă modificate genetic, în

55 comparație cu liniile celulare de mamifere utilizate în timpul de față, îl constituie capacitatea de a controla profilul de glicozilare a glicoproteinelor produse în celule, astfel încât pot fi obținute compoziții de glicoproteine în care predomină o anumită structură de N-glican (US 7029872; US 7449308). Aceste celule gazdă modificate genetic au fost folosite pentru a produce anticorpi

având în mod predominant structuri de N-glican specifice (Li et al. Nat. Biotechnol., no 24, 2006, p. 210-215).

În variantele particulare de realizare, anticorpii și fragmentele acestora de legare a ului, dezvoltate în documentul de față (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 și versiunile umanizate ale acestora), includ suplimentar anticorpii și fragmentele produși în celulele gazdă de eucariote inferioare și cuprinzând N-glicani hibridi și complecși fucozilați și non-fucozilați, inclusiv molecule bi-sectionate și multiantenice, cuprinzând, dar fără a se limita la aceștia, N-glicani, cum ar fi  $\text{GlcNAc}_{(1-4)}\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ;  $\text{Gal}_{(1-4)}\text{GlcNAc}_{(1-4)}\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ;  $\text{NANA}_{(1-4)}\text{Gal}_{(1-4)}\text{GlcNAc}_{(1-4)}\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ .

În variante particulare de realizare, anticorpii și fragmentele acestora de legare a antigenului, prezentați în acest document (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 și versiunile umanizate ale acestora), pot cuprinde anticorpi sau fragmente având cel puțin un N-glican hibrid, selectat din grupul constând din  $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ ;  $\text{GalGlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ ; și  $\text{NANAGalGlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ . În anumite aspecte, N-glicanul hibrid prezintă specia predominantă de N-glicani din compoziție.

În variante particulare de realizare, anticorpii și fragmentele acestora de legare a antigenului, prezentați în documentul de față (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 și versiunile umanizate ale acestora), cuprind anticorpi și fragmente având cel puțin un N-glican complex, selectat din grupul constând din  $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ ;  $\text{GalGlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ ;  $\text{NANAGalGlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ ;  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ;  $\text{GalGlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ;  $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ;  $\text{NANAGal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ; și  $\text{NANA}_2\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ . În aspecte particulare de realizare, N-glicanii complecși constituie specia predominantă de N-glicani din compoziție. În aspectele următoare, N-glicanul complex prezintă o specie particulară de N-glicani care constituie aproximativ 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% sau 100% din N-glicanii complecși din compoziție. Într-o variantă de realizare, anticorpii sau fragmentele acestuia de legare a antigenului, prezentați în prezentul document, cuprind N-glicani complecși, în care cel puțin 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% sau 100% din N-glicanii complecși conțin structura  $\text{NANA}_2\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ , în care o astfel de structură este afucozilată. Astfel de structuri pot fi obținute, de exemplu, în celulele gazdă modificate *Pichia pastoris*.

În variante particulare de realizare, N-glicanul este fucozilat. De regulă, fucosa se află într-o legătură  $\alpha 1,3$  cu GlcNAc la capătul reducător al N-glicanului, într-o legătură  $\alpha 1,6$  cu GlcNAc la capătul reducător al N-glicanului, într-o legătură  $\alpha 1,2$  cu GlcNAc la capătul nereducător al N-glicanului, într-o legătură  $\alpha 1,3$  cu GlcNAc la capătul nereducător al N-glicanului sau într-o legătură  $\alpha 1,4$  cu GlcNAc la capătul nereducător al N-glicanului.

Astfel, în aspectele particulare menționate mai sus ale compozițiilor glicoproteince, glicoforă prezintă o fucoză cu o legătură  $\alpha 1,3$  sau  $\alpha 1,6$  pentru a produce glicoforă, selectată din grupul constând din  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$ ,  $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$ ,  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$ ,  $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$ ,  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$ ,  $\text{GalGlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$ ,  $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$ ,  $\text{NANAGal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$ , și  $\text{NANA}_2\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc})$ ; o fucoză cu o legătură  $\alpha 1,3$  sau  $\alpha 1,4$  pentru a produce glicoforă, selectată din grupul constând din  $\text{GlcNAc}(\text{Fuc})\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{GlcNAc}(\text{Fuc})\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc}_{1-2})\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{GalGlcNAc}_2(\text{Fuc}_{1-2})\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc}_{1-2})\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{NANAGal}_2\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc}_{1-2})\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ , și  $\text{NANA}_2\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2(\text{Fuc}_{1-2})\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ; sau o fucoză cu o legătură  $\alpha 1,2$  pentru a produce glicoforă, selectată din grupul constând din  $\text{Gal}(\text{Fuc})\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Gal}_2(\text{Fuc}_{1-2})\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{NANAGal}_2(\text{Fuc}_{1-2})\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ , și  $\text{NANA}_2\text{Gal}_2(\text{Fuc}_{1-2})\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ .

În următoarele aspecte de realizare, anticorpii (de exemplu, anticorpii umanizați) sau fragmentele acestora de legare a antigenului cuprind N-glicani cu conținut ridicat de manoză incluzând, dar fără a se limita la acestea,  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$ , sau N-glicani constând din structura N-glicanică  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ .

În următoarele aspecte ale celor menționate mai sus, N-glicanii complecși includ suplimentar molecule fucozilate și non-fucozilate bi-sectionate și multiantenice.

Așa cum sunt utilizați în prezentul document, termenii „N-glican” și „glicoforă” sunt folosiți intersanșabil și se referă la o oligozaharidă N-legată, de exemplu, la o oligozaharidă atașată printr-o legătură asparagină-N-acetilglucozamină la un rest de asparagină al unei polipeptide. Glicoproteinele N-legate conțin un rest N-acetilglucozamină legat cu azotul amidic

al unui rest de asparagină din proteină. Zaharurile găsite în mod predominant pe glicoproteine sunt glucoza, galactoza, manoză, fucoza, N-acetilgalactozamina (GalNAc), N-acetilglucozamina (GlcNAc) și acidul sialic (de exemplu, acidul *N*-acetil-neuraminic (NANA)). Prelucrarea grupelor de zaharuri se produce în mod co-translațional în lumenul ER și continuă în mod post-translațional pe complexul Golgi pentru glicoproteinele *N*-legate.

*N*-glicanii posedă un nucleu comun de pentazaharidă  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  (termenul „Man” desemnează manoză; termenul „Glc” desemnează glucoza; și termenul „Nac” desemnează *N*-acetilul; GlcNAc desemnează *N*-acetilglucozamina). De regulă, structurile *N*-glicanilor sunt prezentate cu capătul nereducător în stânga și cu capătul reducător în dreapta. Capătul reducător al *N*-glicanului constituie extremitatea atașată la restul Asn, cuprinzând situsul de glicozilare, pe proteină. *N*-glicanii diferă în ceea ce privește numărul de ramuri (antene) cuprinzând zaharuri periferice (de exemplu, GlcNAc, galactoză, fucoză și acid sialic), care sunt adăugate la structura nucleică  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  („Man3”), menționată de asemenea și ca „nucleu de trimanoză”, „nucleu pentazaharidic” sau „nucleu de paucimanoză”. *N*-glicanii sunt clasificați în funcție de constituenții lor ramificați (de exemplu, cu conținut ridicat de manoză, complecși sau hibrizi). Tipul de *N*-glicani „cu conținut ridicat de manoză” posedă cinci sau mai multe resturi de manoză. *N*-glicanii de tip „complecși” posedă, de regulă, cel puțin un GlcNAc atașat la brațul 1,3 al manozei și cel puțin un GlcNAc atașat la ramura 1,6 a manozei unui nucleu „trimanoză”. *N*-glicanii complecși pot conține, de asemenea, galactoză („Gal”) sau resturi de *N*-acetilgalactozamină („GalNAc”), care, în mod opțional, sunt modificate cu acid sialic sau cu derivați (de exemplu, „NANA” sau „NeuAc”, unde „Neu” desemnează acidul neuraminic și „Ac” desemnează acetilul). *N*-glicanii complecși pot avea, de asemenea, substituții intracatenare care cuprind un GlcNAc „bi-sectiionat” și un fucoză nucleică („Fuc”). *N*-glicanii complecși pot avea, de asemenea, multiple antene pe „nucleul de trimanoză”, denumite adesea și „glicani multiantenici”. *N*-glicanul „hibrid” are cel puțin un GlcNAc pe extremitatea brațului 1,3 de manoză al nucleului de trimanoză și zero sau mai multe resturi de manoză pe brațul 1,6 de manoză al nucleului de trimanoză. Diferiți *N*-glicani sunt denumiți, de asemenea, „glicoforme”.

În ceea ce privește *N*-glicanii complecși, termenii „G-2”, „G-1”, „G0”, „G1”, „G2”, „A1” și „A2” înseamnă următoarele: termenul „G-2” se referă la structura *N*-glicanului care poate fi caracterizată drept  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ; termenul „G-1” se referă la structura *N*-glicanului care poate fi caracterizată drept  $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ ; termenul „G0” se referă la structura *N*-glicanului care poate fi caracterizată drept  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ; termenul „G1” se referă la structura *N*-glicanului care poate fi caracterizată drept  $\text{GalGlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ; termenul „G2” se referă la structura *N*-glicanului care poate fi caracterizată drept  $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ; termenul „A1” se referă la structura *N*-glicanului care poate fi caracterizată drept  $\text{NANAGal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ; și termenul „A2” se referă la structura *N*-glicanului care poate fi caracterizată drept  $\text{NANA}_2\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ . Dacă nu se specifică altfel, termenii „G-2”, „G-1”, „G0”, „G1”, „G2”, „A1” și „A2” se referă la moleculele *N*-glicanului care nu conțin fucoză, atașată la restul de GlcNAc de pe capătul reducător al *N*-glicanului. Când termenul include „F”, atunci acest „F” indică faptul că molecula de *N*-glican conține un rest de fucoză pe restul GlcNAc de pe capătul reducător al *N*-glicanului. De exemplu, toate G0F, G1F, G2F, A1F și A2F indică faptul că *N*-glicanul mai include un rest de fucoză, atașat la restul de GlcNAc de pe capătul reducător al *N*-glicanului. Eucariotele inferioare, cum ar fi drojdia și ciupercile filamentoase, în mod normal nu produc *N*-glicani care conțin fucoză.

În ceea ce privește *N*-glicanii multiantenici, termenul „*N*-glicani multiantenici” se referă la *N*-glicanii care cuprind suplimentar un rest de GlcNAc pe restul de manoză conținând un capăt nereducător al brațului 1,6 sau al brațului 1,3 al *N*-glicanului, sau un rest GlcNAc pe fiecare dintre resturile de manoză conținând un capăt nereducător al brațului 1,6 și al brațului 1,3 al *N*-glicanului. Astfel, *N*-glicanii multiantenici pot fi caracterizați prin formulele  $\text{GlcNAc}_{(2-4)}\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ,  $\text{Gal}_{(1-4)}\text{GlcNAc}_{(2-4)}\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  sau  $\text{NANA}_{(1-4)}\text{Gal}_{(1-4)}\text{GlcNAc}_{(2-4)}\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ . Termenul „1-4” se referă la resturile 1, 2, 3 sau 4.

În ceea ce privește *N*-glicanii bi-sectiionați, termenul „*N*-glican bi-sectiionat” se referă la *N*-glicanii în care restul de GlcNAc este legat de restul de manoză pe capătul reducător al *N*-glicanului. *N*-glicanul bi-sectiionat poate fi caracterizat prin formula  $\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ , în care fiecare rest de manoză este legat cu restul de GlcNAc pe capătul nereducător al acestuia. Spre deosebire de aceasta, atunci când un *N*-glican multiantenic este caracterizat drept

GlcNAc<sub>3</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, formula indică faptul că două resturi de GlcNAc sunt legate la restul de manoză pe capătul nereducător al unuia dintre cele două brațe ale N-glicanilor și un rest de GlcNAc este legat la restul de manoză pe capătul nereducător al celui alt braț al N-glicanului.

#### 5 Proprietățile fizice ale anticorpilor

Anticorpii și fragmentele acestora de legare a antigenului, dezvoltate în documentul de față (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 și versiunile umanizate ale acestora), pot conține suplimentar unul sau mai multe situsuri de glicozilare în regiunea variabilă a lanțului ușor sau a lanțului greu al imunoglobulinei. Astfel de situsuri de glicozilare pot conduce la o imunogenitate crescută a anticorpului sau a fragmentului, sau la o modificare a pK a anticorpului din cauza unei legări modificate a antigenului (Marshall et al. Annu. Rev. Biochem., 1972, p. 41673-41702; Gala and Morrison. J. Immunol., no 172, 2004, p. 5489-5494; Wallick et al. J. Exp. Med., no 168, 1988, p. 1099-1109; Spiro. Glycobiology, no 12, 2002, p. 43R-56R; Parekh et al., (1985) Nature, no 316, p. 452-457; Mimura et al. Mol. Immunol., no 37, 2000, p. 697-706). Este cunoscut faptul că glicozilarea se produce pe motivele care conțin secvența N-X-S/T.

Fiecare anticorp sau fragment de legare a antigenului (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 sau versiunile umanizate ale acestora) posedă un punct izoelectric unic (pI), care se încadrează, de regulă, în diapazonul pH-ului dintre 6 și 9,5. pI pentru un anticorp IgG1 se încadrează, de regulă, în diapazonul pH-ului dintre 7 și 9,5, iar pI pentru un anticorp IgG4 se încadrează, de regulă, în diapazonul pH-ului dintre 6 și 8.

Fiecare anticorp sau fragment de legare a antigenului (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 sau versiunile umanizate ale acestora) posedă o temperatură specifică de topire, unde cea mai înaltă temperatură de topire indică o mai mare stabilitate generală *in vivo* (Krishnamurthy R. and Manning M.C. Curr. Pharm. Biotechnol., no 3, 2002, p. 361-371). De regulă, T<sub>M1</sub> (temperatura desfășurării inițiale), poate fi mai mare de 60°C, mai mare de 65°C, sau mai mare de 70°C. Temperatura de topire a unui anticorp sau a unui fragment poate fi măsurată cu ajutorul calorimetriei cu scanare diferențială (Chen et al. Pharm. Res., no 20, 2003, p. 1952-1960; Ghirlando et al. Immunol. Lett., no 68, 1999, p. 47-52) sau cu dicroism circular (Murray et al. J. Chromatogr. Sci., no 40, 2002, p. 343-349).

În următorul exemplu de realizare, anticorpii și fragmentele acestora de legare a antigenului (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 și versiunile umanizate ale acestora) sunt selectați astfel, încât să nu degradeze rapid. Degradarea unui anticorp sau a unui fragment poate fi măsurată cu ajutorul electroforezei capilare (CE) și al MALDI-MS (Alexander A.J. and Hughes D.E. Anal. Chem., no 67, 1995, p. 3626-3632).

În următoarea variantă de realizare, anticorpii (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 și versiunile lor umanizate) și fragmentele acestora de legare a antigenului sunt selectați astfel, încât să arate efecte minime de agregare, care pot conduce la declanșarea unui răspuns imun nedorit și/sau la proprietăți farmacocinetice modificate sau nefavorabile. De regulă, sunt acceptabili anticorpii și fragmentele cu o agregare de 25% sau mai puțin, 20% sau mai puțin, 15% sau mai puțin, 10% sau mai puțin ori 5% sau mai puțin. Agregarea poate fi măsurată prin mai multe procedee, inclusiv prin cromatografia de excludere sterică (SEC), cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC) și difuzia luminii.

#### Conjugatele anticorpilor

Anticorpii anti-TIGIT și fragmentele acestora de legare a antigenului, dezvoltate în documentul de față (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 și versiunile umanizate ale acestora), pot fi, de asemenea, conjugați cu un grup chimic. Grupul chimic poate prezenta, *inter alia*, un polimer, un radionuclid sau un factor citotoxic. În variante particulare de realizare, grupul chimic prezintă un polimer care mărește timpul de înjumătățire al anticorpului sau al fragmentului în organismul subiectului. Polimerii adecvați includ, dar nu se limitează la aceștia, polimeri hidrofilii, care conțin, dar nu se limitează la aceștia, polietilen glicol (PEG) (de exemplu, PEG cu o greutate moleculară de 2 kDa, 5 kDa, 10 kDa, 12 kDa, 20 kDa, 30 kDa sau 40 kDa), dextran și monometoxipolietilen glicol (mPEG). Sunt dezvoltate anticorpii cu un singur lanț, conjugați cu PEG (Lee et al. Bioconj. Chem., no 10, 1999, p. 973-981). Mai este descrisă conjugarea anticorpilor cu PEG, care este atașat la un chelator de radiometale (acid dietilentriaminpentaacetic (DTPA) (Wen et al. Bioconj. Chem., no 12, 2001, p. 545-553).

Anticorpii și fragmentele acestora de legare a antigenului, dezvoltate în documentul de față (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 și versiunile umanizate ale acestora), pot fi, de asemenea, conjugați cu marcaje precum <sup>99</sup>Tc, <sup>90</sup>Y, <sup>111</sup>In, <sup>32</sup>P, <sup>14</sup>C, <sup>125</sup>I, <sup>3</sup>H, <sup>131</sup>I, <sup>11</sup>C, <sup>15</sup>O, <sup>13</sup>N, <sup>18</sup>F, <sup>35</sup>S, <sup>51</sup>Cr,

<sup>57</sup>To, <sup>226</sup>Ra, <sup>60</sup>Co, <sup>59</sup>Fe, <sup>57</sup>Se, <sup>152</sup>Eu, <sup>67</sup>Cu, <sup>217</sup>Pb, <sup>211</sup>At, <sup>212</sup>Pb, <sup>47</sup>Sc, <sup>109</sup>Pd, <sup>234</sup>Th și <sup>40</sup>K, <sup>157</sup>Gd, <sup>55</sup>Mn, <sup>52</sup>Tr și <sup>56</sup>Fe.

Anticorpul și fragmentele de legare a antigenului, dezvoltate în prezenta descriere (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 și versiunile umanizate ale acestora), pot fi, de asemenea, PEGilate, de exemplu, pentru a crește timpul lor de înjumătățire biologică (de exemplu, în ser). Pentru a PEGila un anticorp sau un fragment, în mod tipic anticorpul sau fragmentul este supus interacțiunii cu o formă reactivă de polietilen glicol (PEG), cum ar fi un ester reactiv sau un derivat de aldehydă PEG, în condițiile în care una sau mai multe grupuri PEG se atașează la anticorp sau la fragmentul acestuia. În variante particulare de realizare, PEGilarea este realizată printr-o reacție de acilare sau o reacție de alchilare cu o moleculă reactivă de PEG (sau un polimer analog solubil în apă reactiv). Așa cum este utilizat în descrierea de față, termenul „polietilen glicol” este destinat să cuprindă toate formele de PEG care sunt utilizate pentru derivarea altor proteine, cum sunt mono(C1-C10) alcoxi- sau ariloxi-polietilen glicol sau polietilen glicol-maleimidă. În anumite variante de realizare, anticorpul sau fragmentul, care urmează să fie PEGilat, constituie un anticorp sau un fragment aglicozilat. Procedeele de PEGilare a proteinelor sunt cunoscute în domeniul de referință și pot fi aplicate pentru anticorpii din invenția solicitată (EP 0154316; EP 0401384).

Anticorpul și fragmentele de legare a antigenului, descriși în documentul de față (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 și versiunile umanizate ale acestora), pot fi, de asemenea, conjugați cu marcaje fluorescente sau chemiluminescente, inclusiv cu fluorofori, cum ar fi chelații de pământuri rare, fluoresceina și derivații săi, rodamina și derivații săi, izotiocianatul, ficoeritina, ficocianina, alloficocianina, o-ftalaldehidă, fluorescamina, <sup>152</sup>Eu, dansilul, umbeliferona, luciferina, marcajul cu luminal, marcajul cu isoluminal, marcajul pe bază de ester de acridiniu aromatic, marcajul cu imidazol, marcajul pe bază de sare de acridinium, marcajul cu ester al acidului oxalic, marcajul cu aequorină, 2,3-dihidroftalazindionă, biotină/avidină, marcaje de spin și radicali liberi stabili.

Anticorpul și fragmentele acestora de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 și versiunile umanizate ale acestora), pot fi, de asemenea, conjugați cu un factor citotoxic, cum ar fi toxina difterică, lanțul A de exotoxină *Pseudomonas aeruginosa*, lanțul A de ricină, lanțul A de abrină, lanțul A de modecină, alfa-sarcină, proteinele și compușii lor (de exemplu, acizii grași) *Aleurites fordii* proteinele diantîn, proteinele PAPI, PAPII și PAPS *Phytoiacca americana*, inhibitorul de *Momordica charantia*, curcinul, crotina, inhibitorul de *saponaria officinalis*, mitogelina, restrictocina, fenomicina și enomicina.

Pentru conjugarea anticorpilor și a fragmentelor acestora de legare a antigenului, conform prezentei invenții (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 și versiunile lor umanizate), cu diferite grupuri, poate fi utilizat orice procedeu, cunoscut în domeniul de referință al tehnicii (inclusiv Hunter et al. Nature, no 144, 1962, p. 945; David et al. Biochemistry, no 13, 1974, p. 1014; Painet et al. J. Immunol. Meth., no 40, 1981, p. 219; Nygren. J. Histochem. and Cytochem., no 30, 1982, p. 407)). Procedeele de conjugare a anticorpilor și a fragmentelor acestora sunt unanim acceptate și foarte bine cunoscute în domeniul dat.

#### Utilizările terapeutice ale anticorpilor anti-TIGIT

În continuare, sunt prezentate procedeele de tratare a subiecților, inclusiv a subiecților umani, care necesită tratament cu anticorpi izolați sau cu fragmentele acestora de legare a antigenului, dezvoltate în prezenta invenție (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 și versiunile umanizate ale acestora). Într-o variantă de realizare a invenției, un asemenea subiect suferă de o infecție sau de o boală infecțioasă. Într-o altă variantă de realizare, un astfel de subiect suferă de o tumoră malignă. Într-o variantă de realizare, cancerul prezintă o tumoră solidă, infiltrată de limfocite tumor-infiltrative exprimând TIGIT. Într-o variantă de realizare, cancerul prezintă, de exemplu, osteosarcom, rabdomiosarcom, neuroblastom, cancer renal, leucemie, cancer renal cu celule tranziționale, cancer de vezică urinară, cancer Wilms, cancer ovarian, cancer pancreatic, cancer de sân, cancer de prostată, cancer osos, cancer pulmonar (de exemplu, cancerul pulmonar non-microcelular), cancer gastric, cancer colorectal, cancer de col uterin, sarcom sinovial, cancerul capului și gâtului, carcinom cu celule scuamoase, mielom multiplu, carcinom renal cu celule clare, retinoblastom, hepatoblastom, carcinom hepatocelular, melanom, tumoră rabdoidă de rinichi, sarcom Ewing, condrosarcom, cancer cerebral, glioblastom, meningiom, adenom hipofizar, schwannoma vestibular, tumoră neuroectodermală primitivă, meduloblastom, astrocitom, astrocitom anaplastic, oligodendrogliom, ependimom, papilom de plex coroid, policitemie vera, trombocitemie, mielofibroză idiopatică, sarcom de țesuturi moi, cancer

tiroidian, cancer endometrial, cancer carcinoid sau cancer hepatic, cancer de san sau cancer gastric. Intr-o variantă de realizare a invenției, tumoarea malignă prezintă un cancer metastatic, de exemplu, din varietățile menționate mai sus.

5 Intr-o variantă de realizare, prezenta invenție se referă la procedeele de tratare a subiecților folosind un anticorp anti-TIGIT sau un fragment al acestuia de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 și versiunile umanizate ale acestora), în care subiectul suferă de o infecție virală. Într-o variantă de realizare, infecția virală este infecția cu un virus, selectat din grupul format din virusul imunodeficienței umane (HIV), virusul hepatic (A, B sau C), virusul herpetic (de exemplu, VZV, HSV-I, HAV-6, HSV-II și CMV, virusul Epstein-Barr), adenovirus, virus gripal, flavivirusuri, echovirus, rinovirus, virusul Cocksackie, coronavirus, virus sincițial respirator, virusul oreionului, rotavirus, virusul rujeolei, virusul rubeolei, parvovirus, virusul vaccinia, virusul HTLV, virusul dengue, papilomavirus, virusul molluscum contagiosum, poliovirus, virusul rabiei, virusul JC sau virusul encefalitei arbovirale.

15 Intr-o variantă de realizare, invenția se referă la procedeele de tratare a subiecților folosind un anticorp anti-TIGIT sau un fragment al acestuia de legare a antigenului, conform invenției, în care subiectul suferă de o infecție bacteriană. Într-o variantă de realizare, infecția bacteriană este infecția cu o bacterie, selectată din grupul constând din *Chlamidia*, bacterii rickettsia, micobacterii, stafilococi, streptococi, pneumonococi, meningococi și gonococi, klebsiella, proteus, serratia, pseudomonas, *Legionella*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Salmonella*, bacili, *Vibrio cholerae*, *Clostridium tetan*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium lepromatosis* și *Borriella*.

20 Intr-o variantă de realizare, invenția se referă la procedeele de tratare a subiecților folosind un anticorp anti-TIGIT sau un fragment al acestuia de legare a antigenului, conform invenției, în care subiectul suferă de o infecție fungică. Într-o variantă de realizare, infecția fungică este infecția cu o ciupercă, selectată din grupul constând din *Candida* (*albicans*, *krusei*, *glabrata*, *tropicalis* etc.), *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* (*fumigatus*, *niger* etc.), Genus *Mucorales* (*mucor*, *absidia*, *rhizopus*), *Sporotrix schenkii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* și *Histoplasma capsulatum*.

25 Intr-o variantă de realizare, invenția se referă la procedeele de tratare a subiecților folosind un anticorp anti-TIGIT sau un fragment al acestuia de legare a antigenului, conform invenției, în care subiectul suferă de o infecție parazitară. Într-o variantă de realizare, infecția parazitară este infectarea cu un parazit, selectat din grupul constând din *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba*, *Giardia Lambia*, *Cryptosporidium*, *Pneumocystis carinii*, *Plasmodium vivax*, *Babesia microti*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii* și *Nippostrongylus brasiliensis*.

30 Totodată, prezenta invenție se referă la un procedeu de prevenire sau de inhibare a legării TIGIT cu MHC clasa II, de sporire a activării celulelor T antigen-specific sau de stimulare a producției interleukinei-2 de către celulele T la un subiect (de exemplu, un subiect uman), de exemplu, în care subiectul suferă de o tumoră malignă sau de o boală infecțioasă (de exemplu, așa cum este discutat în invenția de față) cuprinzând administrarea unei cantități eficiente dintr-un anticorp anti-TIGIT sau dintr-un fragment al acestuia de legare a antigenului (de exemplu, 14A6, 28A5, 31C6 și versiunile umanizate ale acestora), în mod opțional, în asociere cu un agent chimioterapeutic suplimentar.

35 Un „subiect” poate fi un mamifer, precum om, caine, pisică, cal, vacă, șoarece, șobolan, maimuță (de exemplu, maimuțe cynomolgus, de exemplu, *Macaca fascicularis*) sau iepure. În exemplele de realizare preferabile ale prezentei invenții subiectul prezintă un subiect uman.

40 În variante particulare de realizare a invenției, anticorpii sau fragmentele acestora de legare a antigenului, dezvoltate în documentul de față (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 și versiunile umanizate ale acestora), pot fi utilizați de sine stătător sau în asociere cu alți agenți terapeutici suplimentari și/sau proceduri terapeutice, pentru tratarea sau prevenirea oricărei maladii, cum ar fi tumoarea malignă, de exemplu, așa cum este discutat în documentul de față, la un subiect care are nevoie de un astfel de tratament sau de o astfel de prevenire. Compozițiile, de exemplu, compozițiile farmaceutice care cuprind un purtător acceptabil farmaceutic conținând astfel de anticorpi și fragmente, în asociere cu agenți terapeutici suplimentari, sunt, de asemenea, 45 parte a prezentei invenții.

50 În unele variante particulare de realizare a prezentei invenții, anticorpii sau fragmentele acestora de legare a antigenului, dezvoltate în documentul de față (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 și versiunile umanizate ale acestora), pot fi utilizați de sine stătător sau în asociere cu vaccinuri tumorale.

În unele variante particulare de realizare, anticorpul sau fragmentele acestora de legare a antigenului, descriși în documentul de față (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 și versiunile umanizate ale acestora), pot fi utilizați de sine stătător sau în asociere cu agenți chimioterapeutici.

5 În unele variante particulare de realizare, anticorpul sau fragmentele acestora de legare a antigenului, descriși în documentul de față (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 și versiunile umanizate ale acestora), pot fi utilizați de sine stătător sau în asociere cu radioterapie.

În unele variante particulare de realizare, anticorpul sau fragmentele acestora de legare a antigenului, descriși în documentul de față (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 și versiunile umanizate ale acestora), pot fi utilizați de sine stătător sau în asociere cu terapii direcționate. Exemplele de terapii direcționate includ: terapii hormonale, inhibitori de transmitere a semnalului (de exemplu, inhibitorii EGFR, cum sunt cetuximab (Erbix) și erlotinib (Tarceva)); inhibitorii HER2 (de exemplu, trastuzumab (Herceptin) și pertuzumab (Perjeta)); inhibitorii BCR-ABL (cum sunt imatinib (Gleevec) și dasatinib (Sprycel)); inhibitorii ALK (cum sunt crizotinib (Xalkori) și ceritinib (Zykadia)); inhibitorii BRAF (cum sunt vemurafenib (Zelboraf) și dabrafenib (Tafinlar)), modulatori de expresie a genelor, inductori ai apoptozei (de exemplu, bortezomib (Velcade) și carfilzomib (Kyprolis)), inhibitorii de angiogeneză (de exemplu, bevacizumab (Avastin) și ramucirumab (Cyramza)), anticorpi monoclonali atașați la toxine (de exemplu, brentuximab vedotin (Adcetris) și ado-trastuzumab emtansine (Kadcyla)).

20 În unele variante particulare de realizare, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentele acestora de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 și versiunile umanizate ale acestora), pot fi utilizați în combinație cu un agent terapeutic anti-cancer sau cu un agent imunomodulator, cum ar fi un inhibitor al receptorului imunomodulator, de exemplu, un anticorp sau un fragment al acestuia de legare a antigenului care se leagă în mod specific cu receptorul dat.

25 Astfel, prezenta invenție se referă la compoziții care cuprind un anticorp anti-TIGIT sau un fragment al acestuia de legare a antigenului, conform prezentei invenții (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 și versiuni umanizate ale acestora), în asociere cu pembrolizumab; precum și la procedee de tratare sau de prevenire a cancerului la un subiect care cuprinde administrarea unei cantități eficiente dintr-un anticorp anti-TIGIT sau dintr-un fragment al acestuia de legare a antigenului și pembrolizumab la subiectul în cauză. În mod opțional, subiectului i se administrează, de asemenea, un agent terapeutic suplimentar.

30 Într-un exemplu de realizare a invenției, un anticorp anti-TIGIT sau un fragment al acestuia de legare a antigenului, conform prezentei invenții (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 și versiunile umanizate ale acestora), este prezent în asociere cu un anticorp izolat care cuprinde lanțul greu al imunoglobulinei conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 33 și lanțul ușor al imunoglobulinei conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 34. SECV. ID NR. 33 și SECV. ID NR. 34 codifică lanțul greu și lanțul ușor al pembrolizumabului.

40 Într-una dintre variantele de realizare a invenției, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform prezentei invenții (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 și versiunile umanizate ale acestora), este prezent în asociere cu un anticorp izolat care cuprinde lanțul greu al imunoglobulinei conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 35 și lanțul ușor al imunoglobulinei conținând secvența de aminoacizi din SECV. ID NR. 36. SECV. ID NR. 35 și SECV. ID NR. 36 codifică lanțul greu și lanțul ușor al nivolumabului.

45 Într-una dintre variantele de realizare a invenției, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 și versiunile umanizate ale acestora), este prezent în asociere cu unul sau cu mai mulți dintre: anticorpul anti-PD1 (de exemplu, pembrolizumab, nivolumab, pidilizumab (CT-011)), anticorpul anti-PDL1, anticorpul anti-CTLA4, anticorpul anti-CS1 (de exemplu, elotuzumab), anticorpul anti-KIR2DL1/2/3 (de exemplu, lirilumab), anticorpul anti-CD137 (de exemplu, urelumab), anticorpul anti-GITR (de exemplu, TRX518), anticorpul anti-PD-L1 (de exemplu, BMS-936559, MSB0010718C sau MPDL3280A), anticorpul anti-PD-L2, anticorpul anti-ILT1, anticorpul anti-ILT2, anticorpul anti-ILT3, anticorpul anti-ILT4, anticorpul anti-ILT5, anticorpul anti-ILT6, anticorpul anti-ILT7, anticorpul anti-ILT8, anticorpul anti-CD40, anticorpul anti-OX40, anticorpul anti-ICOS, anticorpul anti-SIRPα, anticorpul anti-KIR2DL1, anticorpul anti-KIR2DL2/3, anticorpul anti-KIR2DL4, anticorpul anti-KIR2DL5A, anticorpul anti-KIR2DL5B, anticorpul anti-KIR3DL1, anticorpul anti-KIR3DL2, anticorpul anti-KIR3DL3, anticorpul anti-NKG2A, anticorpul anti-NKG2C, anticorpul anti-NKG2E, anticorpul anti- 4-1BB (de exemplu,

PF-05082566), anticorpul anti-TSLP, anticorpul anti-IL-10, IL-10 sau IL-10 PEGilat, sau oricare inhibitor de molecule organice mici a unor asemenea ținte.

5 Intr-una din variantele de realizare a invenției, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 sau versiunile umanizate ale acestora), prezintă o asociere cu anticorpul anti-PD1.

Intr-una din variantele de realizare a invenției, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 sau versiunile umanizate ale acestora), prezintă o asociere cu anticorpul anti-PDL1 (de exemplu, BMS-936559, MSB0010718C sau MPDL3280A).

10 Intr-una din variantele de realizare a invenției, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 sau versiunile umanizate ale acestora), prezintă o asociere cu anticorpul anti-CTLA4.

Intr-una din variantele de realizare a invenției, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 sau versiunile umanizate ale acestora), prezintă o asociere cu anticorpul anti-CS1.

15 Intr-una din variantele de realizare a invenției, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 sau versiunile umanizate ale acestora), prezintă o asociere cu anticorpul anti-KIR2DL1/2/3.

20 Intr-una din variantele de realizare a invenției, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 sau versiunile umanizate ale acestora), prezintă o asociere cu anticorpul anti-CD137 (de exemplu, urelumab).

25 Intr-una din variantele de realizare a invenției, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 sau versiunile umanizate ale acestora), prezintă o asociere cu anticorpul anti-GITR (de exemplu, TRX518).

Intr-una din variantele de realizare a invenției, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 sau versiunile umanizate ale acestora), prezintă o asociere cu anticorpul anti-PD-L2.

30 Intr-una din variantele de realizare a invenției, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 sau versiunile umanizate ale acestora), prezintă o asociere cu anticorpul anti-ITL1.

Intr-una din variantele de realizare a invenției, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 sau versiunile umanizate ale acestora), prezintă o asociere cu anticorpul anti-ITL2.

35 Intr-una din variantele de realizare a invenției, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 sau versiunile umanizate ale acestora), prezintă o asociere cu anticorpul anti-ITL3.

40 Intr-una din variantele de realizare a invenției, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 sau versiunile umanizate ale acestora), prezintă o asociere cu anticorpul anti-ITL4.

Intr-una din variantele de realizare a invenției, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 sau versiunile umanizate ale acestora), prezintă o asociere cu anticorpul anti-ITL5.

45 Intr-una din variantele de realizare a invenției, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 sau versiunile umanizate ale acestora) prezintă o asociere cu anticorpul anti-ITL6.

Intr-una din variantele de realizare a invenției, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 sau versiunile umanizate ale acestora), prezintă o asociere cu anticorpul anti-ITL7.

50 Intr-una din variantele de realizare a invenției, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 sau versiunile umanizate ale acestora) prezintă o asociere cu un anticorp anti-ITL8.

55 Intr-una din variantele de realizare a invenției, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 sau versiunile umanizate ale acestora), prezintă o asociere cu anticorpul anti-CD40.

Intr-una din variantele de realizare a invenției, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 sau versiunile umanizate ale acestora), prezintă o asociere cu anticorpul anti-OX40.

Intr-una din variantele de realizare a invenției, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 sau versiunile umanizate ale acestora), prezintă o asociere cu anticorpul anti-KIR2DL1.

5 Intr-una din variantele de realizare a invenției, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 sau versiunile umanizate ale acestora), prezintă o asociere cu anticorpul anti-KIR2DL2/3.

Intr-una din variantele de realizare a invenției, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 sau versiunile umanizate ale acestora), prezintă o asociere cu anticorpul anti-KIR2DL4.

10 Intr-una din variantele de realizare a invenției, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 sau versiunile umanizate ale acestora), prezintă o asociere cu anticorpul anti-KIR2DL5A.

Intr-una din variantele de realizare a invenției, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 sau versiunile umanizate ale acestora), prezintă o asociere cu anticorpul anti-KIR2DL5B.

15 Intr-una din variantele de realizare a invenției, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 sau versiunile umanizate ale acestora), prezintă o asociere cu anticorpul anti-KIR3DL1.

20 Intr-una din variantele de realizare a invenției, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 sau versiunile umanizate ale acestora), prezintă o asociere cu anticorpul anti-KIR3DL2.

Intr-una din variantele de realizare a invenției, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 sau versiunile umanizate ale acestora), prezintă o asociere cu anticorpul anti-KIR3DL3.

25 Intr-una din variantele de realizare a invenției, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 sau versiunile umanizate ale acestora), prezintă o asociere cu anticorpul anti-NKG2A.

Intr-una din variantele de realizare a invenției, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 sau versiunile umanizate ale acestora), prezintă o asociere cu anticorpul anti-NKG2C.

30 Intr-una din variantele de realizare a invenției, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 sau versiunile umanizate ale acestora), prezintă o asociere cu anticorpul anti-ICOS.

35 Intr-una din variantele de realizare a invenției, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 sau versiunile umanizate ale acestora), prezintă o asociere cu anticorpul anti-SIRP $\alpha$ .

Intr-una din variantele de realizare a invenției, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 sau versiunile umanizate ale acestora), prezintă o asociere cu anticorpul anti-4-1BB.

40 Intr-una din variantele de realizare a invenției, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 sau versiunile umanizate ale acestora), prezintă o asociere cu anticorpul anti-IL-10.

45 Intr-una din variantele de realizare a invenției, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 sau versiunile umanizate ale acestora), prezintă o asociere cu anticorpul anti-TSLP.

Intr-una din variantele de realizare a invenției, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 sau versiunile umanizate ale acestora), prezintă o asociere cu IL-10 sau cu IL-10 PEGilat.

50 Intr-una din variantele de realizare a invenției, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 sau versiunile umanizate ale acestora), este prezent în asociere cu unul sau cu mai mulți inhibitori (de exemplu, cu o moleculă organică mică sau cu un anticorp sau un fragment al acestuia de legare a antigenului), cum ar fi: un inhibitorul mTOR (factorul țintă al rapamicinei la mamifere), un agent citotoxic, un agent pe bază de platină, un inhibitor de EGFR, un inhibitor de VEGF, un stabilizator de microtubuli, un taxan, un inhibitor de CD20, un inhibitor de CD52, un inhibitor de CD30, un inhibitor de RANK (ligandul receptor-activatorului factorului nuclear kappa-B), un inhibitor de RANKL (ligandul receptor-activatorului factorului nuclear kappa-B), un inhibitor de ERK, un inhibitor de MAP Kinaze, un inhibitor de AKT, un inhibitor de MEK, un inhibitor de PI3K, un inhibitor de HER1, un inhibitor de HER2, un inhibitor de HER3, un inhibitor de HER4,

un inhibitor de Bcl-2, un inhibitor de CD22, un inhibitor de CD79b, un inhibitor de ErbB2 sau un inhibitor de farnesil-protein transferază.

Intr-una din variantele de realizare a invenției, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 sau versiunile umanizate ale acestora), este prezent în asociere cu unul sau cu mai mulți dintre:

5 acidul 13-cis-retinoic, 3-[5-(metilsulfonilpiperadinemetil)-indolil]-chinolone, 4-hidroxitamoxifen, 5-deoxiuridin, 5'-deoxi-5-fluorouridin, 5-fluorouracil, 6-mecaptopurină, 7-hidroxiataurosporină, A-443654, abiraterone acetat, abraxane, ABT-578, acolbifene, ADS-100380, ALT-110, altretamină, amifostină, aminoglutetimidă, amrubicin, amsacrină, anagrelidă, anastrozol, angiostatină, AP-23573, ARQ-197, arzoxifen, AS-252424, AS-605240, asparaginază, AT-9263, atrasentan, axitinib, AZD1152, vaccinul *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG), batabulin, BC-210, besodutox, bevacizumab, bicalutamidă, Bio111, BIO140, bleomicină, BMS-214662, BMS-247550, BMS-275291, BMS-310705, bortezomib, buserelin, busulfan, calcitriol, camptotecină, canertinib, capecitabină, carboplatină, carmustină, CC8490, cediranib, CG-1521, CG-781, hlamydocină, clorambucil, clorotoxină, cilengitide, cimetidină, cisplatină, cladribină, clodronat, COL-3 CP-724714, ciclofosamidă, ciproteron, ciproteroneacetate, citarabină, citosinearabinosidă, dacarbazină, dacinostat, dactinomycină, dalotuzumab, danusertib, dasatanib, daunorubicină, decatanib, deguelin, diftitox, docetaxel, dovitinib, doxorubicină, droloxifen, edotecarin, ytriu-90 marcat cu edotreotid, edotreotid, EKB-569, EMD121974, endostatină, enzalutamidă, enzastaurin, epirubicină, epoethilone B, ERA- 923, erbitux, erlotinib, estradiol, estramustină, etopozidă, everolimus, exemestan, ficlatuzumab, finasterid, flavopiridol, floxuridină, fludarabină, fludrocortizon, fluoximesteronă, flutamidă, FOLFOX regimen, fulvestrant, galeterone, gefitinib, gemcitabină, gimatecan, goserelină, acetat de goserelină, gosipol, GSK461364, GSK690693, HMR-3339, hidroxiprogesteron caproat, hidroxiuree, IC87114, idarubicin, idoxifen, ifosfamidă, IM862, imatinib, IMC-1C11, INCB24360, INO1001, interferon, interleukina-12, ipilimumab, irinotecan, JNJ-16241199, ketoconazol, KRX-0402, lapatinib, lasofoxifen, letrozol, leucovorin, leuprolidă, acetat de leuprolidă, levamisol, paclitaxel captat de liposom, lomustină, lonafarnib, lucanton, LY292223, LY292696, LY293646, LY293684, LY294002, LY317615, marimastat, mecloretamină, medroxiprogesteron acetat, megestrol acetat, melfalan, mercaptopurină, mesna, metotrexat, mitramicină, mitomicină, mitotan, mitoxantronă, tozasertib, MLN8054, neovastat, neratinib, neuradiab, nilotinib, nilutimid, nolatrexed, NVP-BEZ235, oblimersen, octreotid, ofatumumab, oregovomab, orteronel, oxaliplatină, paclitaxel, palbociclib, pamidronat, panitumumab, pazopanib, PD0325901, PD184352, PEG-interferon, pemetrexed, pentostatină, perifosin, fenilalanină

35 muștar, PI-103, picilisib, PIK-75, pipendoxifen, PKI-166, plicamicină, porfimer, prednison, procabazină, progestină, PX-866, R-763, raloxifen, raltitrexed, razoxin, ridaforolimus, rituximab, romidepsin, RTA744, rubitecan, scriptaid, Sdx102, seliciclib, selumetinib, semaxanib, SF1126, sirolimus, SN36093, sorafenib, spironolactonă, squalamină, SR13668, streptozocină, SU6668, acid suberoilalanid hidroamic, sunitinib, estrogen sintetic, talampanel, talimogen laherparepvec, tamoxifen, temozolomidă, temsirolimus, tenipoxid, tesmilifen, testosteron, tetrandrină, TGX-221, talidomidă, tioguanină, tiotepa, ticilimumab, tipifarnib, tivozanib, TKI-258, TLK286, topotecan, toremifen citrat, trabectedin, trastuzumab, tretinoin, tricostatina A, monohidrat de triciribinfosfat, triptorelin pamoat, TSE-424, uramustin, acid valproic, valrubicină, vandetanib, vatalanib, capcana de VEGF, vinblastină, vincristină, vindesină, vinorelbină, vitaxin, vitespan, vorinostat, VX-745, wortmannin, Xr311, zanolimumab, ZK186619, ZK-304709, ZM336372, ZSTK474.

Intr-una din variantele de realizare a invenției, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 sau versiunile umanizate ale acestuia), prezintă o asociere cu una sau cu mai multe antiemetice incluzând, dar fara a se limita la acestea: casopitant (GlaxoSmithKline), netupitant (MGI-Helsinn) și alți antagoniști ai receptorului NK-1, palonosetron (comercializat ca Aloxi de către compania MGI Pharma), aprepitant (comercializat ca Emend de către compania Merck și Co.; Rahway, NJ), difenhidramină (comercializat ca Benadryl® de către compania Pfizer, New York, NY), hidroxizin (comercializat ca Atarax® de către compania Pfizer, New York, NY), metoclopramidă (comercializat ca Reglan® de către compania AH Robins Co.; Richmond, VA), lorazepam (comercializat ca Ativan® de către compania Wyeth, Madison, NJ), alprazolam (comercializat ca Xanax de către compania Pfizer, New York, NY), haloperidol (comercializat ca Haldol® de către compania Ortho-McNeil, Raritan, NJ), droperidol (Inapsine®), dronabinol (comercializat ca Marinol® de către compania Solvay Pharmaceuticals, Inc.; Marietta, GA),

dexametazonă (comercializat ca Decadron® de către compania Merck și Co.; Rahway, NJ), metilprednisolon (comercializat ca Medrol® de către compania Pfizer, New York, NY), proclorperazină (comercializat ca Compazine® de către compania Glaxosmithkline, Research Triangle Park, NC), granisetron (comercializat ca Kytril® de către compania Hoffmann-La Roche Inc.; Nutley, NJ), ondansetron (comercializat ca Zofran® de către compania Glaxosmithkline, Research Triangle Park, NC), dolasetron (comercializat ca Anzemet® de către compania Sanofi-Aventis, New York, NY), tropisetron (comercializat ca Navoban® de către compania Novartis, East Hanover, NJ).

Alte efecte secundare ale tratamentului cancerului includ deficitul de globule roșii și albe. În consecință, într-una din variantele de realizare a invenției, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 sau versiunile umanizate ale acestora) prezintă o asociere cu un agent care tratează sau care previne o astfel de deficiență, cum ar fi, de exemplu, filgrastim, PEG-filgrastim, eritropoietină, epoetină alfa sau darbepoetină alfa.

Intr-una dintre variantele de realizare a invenției, anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul acesteia de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 sau versiunile umanizate ale acestora), se administrează în asociere cu radioterapia anticanceroasă. De exemplu, într-o variantă de realizare a invenției, radioterapia este o terapie cu fascicul extern (EBT): un procedeu de furnizare a fasciculului de raze-X de înaltă energie la locul tumorii. Fasciculul este generat în exteriorul organismului pacientului (de exemplu, printr-un accelerator liniar) și este orientat la locul tumorii. Aceste raze X pot distruge celulele canceroase, iar o planificare minuțioasă a tratamentului permite ca țesuturile normale adiacente să fie protejate de acțiunea lor. În interiorul organismului pacientului nu este plasată nici o sursă radioactivă. Într-o variantă de realizare a invenției, radioterapia prezintă o terapie prin fascicul de protoni: un tip de terapie conformală care bombardează țesutul bolnav cu protoni, în loc de raze X. Într-o variantă de realizare a invenției, radioterapia prezintă o terapie conformală cu fascicul extern: un procedeu care utilizează o tehnologie avansată pentru a adapta radioterapia la structurile organismului individului. Într-o variantă de realizare a invenției, radioterapia prezintă brahiterapie: plasarea temporară a materialelor radioactive în interiorul organismului pacientului, folosită, de regulă, pentru a administra o doză suplimentară sau pentru a mări intensitatea radiației într-o anumită zonă.

Intr-o variantă de realizare a invenției, procedura chirurgicală, administrată în asociere cu un anticorp anti-TIGIT sau cu un fragment al acestuia de legare a antigenului (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 sau versiunile umanizate ale acestora), prezintă o tumorectomie chirurgicală.

Termenul „în asociere cu” indică faptul că componentele, administrate printr-un procedeu conform prezentei invenții (de exemplu, un anticorp anti-TIGIT, de exemplu, un anticorp umanizat), sau un fragment al acestuia de legare a antigenului (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 sau versiunile lor umanizate), împreună cu pembrolizumab)) pot fi constituite într-o singură compoziție, pentru o aplicare simultană, sau pot fi constituite separat, în două sau mai multe compoziții (de exemplu, un kit). Fiecare componentă poate fi administrată la un subiect într-un moment de timp diferit de cel în care se administrează un alt component; de exemplu, fiecare administrare poate fi efectuată non-simultan (de exemplu, separat sau succesiv) în câteva intervale ale unei anumite perioade de timp. Totodată, componentele separate pot fi administrate unui subiect prin același sau printr-un alt procedeu.

#### Utilizări experimentale și diagnostice

Anticorpii anti-TIGIT și fragmentele acestora de legare a antigenului, dezvoltate în prezenta invenție (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 și versiunile umanizate ale acestora), pot fi utilizați în calitate de agenți de purificare a afinității. În acest proces, anticorpii anti-TIGIT și fragmentele acestora de legare a antigenului sunt imobilizați pe o fază solidă, cum este Sephadex, sticlă sau rășină de agaroză, sau hârtie de filtru, utilizând procedeele bine cunoscute în domeniul de referință. Anticorpul sau fragmentul imobilizat este pus în contact cu o probă conținând proteina TIGIT (sau un fragment al acestuia) care urmează să fie purificată și apoi substratul este spălat cu un solvent adecvat, care poate îndepărta, practic, tot materialul din probă, cu excepția proteinei TIGIT, care este legată la anticorpul sau fragmentul imobilizat. În cele din urmă, substratul este spălat cu un solvent care eluează TIGIT-ul legat (de exemplu, proteina A). Astfel de anticorpi și fragmente imobilizate fac parte din prezenta invenție.

În continuare, sunt prezentați antigeni pentru generarea anticorpilor secundari care pot fi utilizați, de exemplu, pentru efectuarea analizelor Western și altor imunoteste, discutate în

prezenta invenție. În particular, sunt dezvăluite polipeptide care cuprind regiunile variabile și/sau secvențele CDR ale unui anticorp terapeutic, descris în documentul de față (de exemplu, 14A6, 28H5 sau 31C6), și care pot fi utilizate pentru a genera anticorpi anti-idiotipici pentru aplicare la detectarea specifică a prezenței anticorpului, de exemplu, într-un context terapeutic.

5 Anticorpii anti-TIGIT (de exemplu, anticorpi umanizați) și fragmentele acestora de legare a antigenului pot fi, de asemenea, utilizați în teste diagnostice ale proteinei TIGIT, de exemplu, la detectarea expresiei sale în celule specifice, în țesuturi sau ser, de exemplu, în celulele tumorale, cum sunt celulele de melanom. Astfel de procedee de diagnostic pot fi utilizate la determinarea unor diverse afecțiuni.

10 Prezenta invenție se referă la testele ELISA (teste pentru imunoabsorbția enzimelor) care includ utilizarea unui anticorp anti-TIGIT sau a unui fragment al acestuia de legare a antigenului, dezvăluit în documentul de față (de exemplu, 14A6 sau o versiune umanizată a acestuia).

De exemplu, un astfel de procedeu cuprinde următoarele etape:

15 (a) acoperirea unui substrat (de exemplu, suprafața unei cavități de pe o placă de microtitrare, de exemplu, o placă de plastic) cu anticorpul anti-TIGIT sau cu fragmentul acestuia de legare a antigenului;

(b) aplicarea unei probe care urmează să fie testată la prezența TIGIT-ului pe substrat;

(c) spălarea plăcii, astfel încât materialul nelegat din probă este îndepărtat;

20 (d) introducerea anticorpilor marcați prin marcaj detectabil (de exemplu, anticorpi legați la enzyme), care, de asemenea, sunt specifici antigenului TIGIT;

(e) spălarea substratului, astfel încât anticorpii marcați nelegați sunt eliminați;

(f) în cazul în care anticorpii marcați sunt legați cu enzima, se introduce o substanță chimică care este transformată de către enzimă într-un semnal fluorescent; și

(g) detectarea prezenței anticorpului marcat.

25 Detectarea marcajului, asociat cu substratul, indică prezența proteinei TIGIT.

Intr-o următoarea variantă de realizare, anticorpul marcat sau fragmentul acestuia de legare a antigenului este marcat cu ajutorul peroxidazei care reacționează cu ABTS (de exemplu, acid 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonic)) sau 3,3',5,5'-tetrametilbenzidină pentru a obține schimbarea culorii, care poate fi detectată. În mod alternativ, anticorpul sau fragmentul marcat este marcat cu un radioizotop detectabil (de exemplu,  $^3\text{H}$ ) care poate fi identificat cu ajutorul unui contor de scintilație în prezența unui scintilator.

30 Un anticorp anti-TIGIT sau un fragment al acestuia de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 sau versiunile umanizate ale acestora), poate fi utilizat într-un test Western blot sau de imunoblot al proteinelor. O astfel de procedură face parte din prezenta invenție și include, de exemplu:

35 (1) transferarea opțională a proteinelor dintr-o probă care urmează să fie testată la prezența TIGIT-ului (de exemplu, după separarea electroforetică a proteinelor dintr-o probă prin intermediul PAGE sau SDS-PAGE) pe o membrană sau pe un alt substrat solid folosind un procedeu cunoscut în domeniul de referință (de exemplu, blotting semi-uscă sau blotting în rezervor); contactarea membranei sau a altui substrat solid pentru a fi testate la prezența TIGIT-ului legat sau a unui fragment al acestuia cu un anticorp anti-TIGIT sau cu un fragment al acestuia de legare a antigenului, conform invenției.

40 O astfel de membrană poate lua forma unei membrane pe bază de nitroceluloză sau de vinil (de exemplu, fluorură de poliviniliden (PVDF)) pe care au fost transferate proteinele care trebuie să fie testate la prezența TIGIT-ului într-un gel pentru PAGE non-denaturant (electroforeză în gel de poliacrilamidă) sau în gel pentru SDS-PAGE (electroforeză în gel de poliacrilamidă cu dodecil sulfat de sodiu) (de exemplu, după separarea electroforetică în gel). Înainte de a pune membrana în contact cu anticorpul anti-TIGIT sau cu fragmentul, membrana este în mod opțional blocată, de exemplu, cu lapte praf degresat sau cu altele similare, astfel

50 încât să lege situsurile nespecifice de legare a proteinelor pe membrană.

(2) spălarea membranei o dată sau de mai multe ori pentru a îndepărta anticorpul anti-TIGIT nelegat sau fragmentul acestuia și alte substanțe nelegate; și

(3) detectarea anticorpului anti-TIGIT legat sau a fragmentului.

55 Detectarea anticorpului legat sau a fragmentului indică faptul că proteina TIGIT este prezentă pe membrană sau pe substrat și în probă. Detectarea anticorpului legat sau a fragmentului poate fi efectuată prin intermediul legării anticorpului sau a fragmentului cu un anticorp secundar (un anticorp anti-imunoglobulină), marcat cu un marcaj detectabil, și, ulterior, prin identificarea prezenței anticorpului secundar.

Anticorpilor anti-TIGIT și fragmentele acestora de legare a antigenului, descriși în documentul de față (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 și versiunile umanizate ale acestora), pot fi, de asemenea, utilizați pentru imunohistochimie. Un astfel de procedeu face parte din prezenta invenție și cuprinde, de exemplu,

5 (1) punerea în contact a unei celule (de exemplu, a unei celule tumorale, cum ar fi o celulă de melanom), care urmează să fie testată la prezența proteinei TIGIT, cu un anticorp anti-TIGIT sau un fragment al acestuia de legare a antigenului, conform invenției; și

(2) detectarea anticorpului sau a fragmentului pe- sau în celulă.

10 În cazul în care anticorpul sau fragmentul ca atare este marcat cu un marcaj detectabil, acesta poate fi detectat în mod direct. Ca alternativă, anticorpul sau fragmentul poate fi legat cu un anticorp secundar marcat cu un marcaj detectabil, care este apoi identificat.

Anumiți anticorpi anti-TIGIT și fragmentele acestora de legare a antigenului, descriși în documentul de față (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 și versiunile umanizate ale acestora), pot fi, de asemenea, utilizați pentru vizualizarea tumorilor *in vivo*. Un astfel de procedeu poate include  
15 injectarea unui anticorp anti-TIGIT radiomarcant sau a unui fragment al acestuia de legare a antigenului în organismul unui pacient care urmează să fie testat la prezența unei tumori, asociate cu expresia TIGIT (de exemplu, care exprimă TIGIT, de exemplu, pe suprafața celulei tumorale), urmată de vizualizarea nucleară a organismului pacientului pentru a detecta prezența anticorpului sau a fragmentului marcat, de exemplu, în loci care conțin o concentrație ridicată de anticorp sau  
20 de fragment legați la tumoare. Detectarea locilor indică prezența tumorilor TIGIT<sup>+</sup> și a celulelor tumorale.

Tehnicile de vizualizare includ imagistica SPECT (tomografie computerizată cu emisie de monofotoni) sau imagistica PET (tomografie cu emisie de pozitroni). Marcajele includ, de exemplu, iod-123 (<sup>123</sup>I) și tehneciu-99m (<sup>99m</sup>Tc), de exemplu, în combinație cu imagistica  
25 SPECT sau cu <sup>11</sup>C, <sup>13</sup>N, <sup>15</sup>O sau <sup>18</sup>F, de exemplu, în combinație cu imagistica PET sau cu indiu-111 (Gordon et al. International Rev. Neurobiol, no. 67, 2005, p. 385-440).

#### Compoziții farmaceutice și administrarea lor

Pentru obținerea compozițiilor farmaceutice sau sterile de anticorpi anti-TIGIT și  
30 fragmente ale acestora de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 și versiunile umanizate ale acestora), anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului este amestecat cu un purtător acceptabil farmaceutic sau cu un excipient. A se vedea, de exemplu, *Remington's Pharmaceutical Sciences* și *U.S. Pharmacopeia: National Formulary*, Mack Publishing Company, Easton, PA (1984).

35 Compoziția preparatelor terapeutice și diagnostice poate fi obținută prin amestecarea cu purtători, excipienți sau stabilizatori acceptabili, de exemplu, sub formă de pulberi liofilizate, paste, soluții apoase sau suspensii (a se vedea, de exemplu, Hardman și colab. (2001) *Goodman și Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill, New York, NY; Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Lippincott, Williams și Wilkins, New York, NY; Avis, și colab. (ed.) (1993) *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications*, Marcel Dekker, NY; Lieberman, și colab. (ed.) (1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*, Marcel Dekker, NY; Lieberman, și colab. (ed.) (1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems*, Marcel Dekker, NY; Weiner și Kotkoskie (2000) *Excipient Toxicity and Safety*, Marcel Dekker, Inc., New York, NY).

45 Toxicitatea și eficacitatea terapeutică a anticorpilor conform invenției, administrați de sine stătător sau în combinație cu un alt agent terapeutic, pot fi determinate prin procedee farmaceutice standard în culturi celulare sau animale experimentale, de exemplu, pentru determinarea LD<sub>50</sub> (doză letală pentru 50% din populație) și ED<sub>50</sub> (doză terapeutică eficientă pentru 50% din populație). Raportul dozei dintre efectele toxice și terapeutice constituie indicele terapeutic (LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>). Datele obținute din aceste teste ale culturilor celulare și studii pe animale  
50 pot fi utilizate la formularea diapazonului de posologie pentru utilizarea la om. Posologia acestor compuși se află, de preferință, într-un diapazon de concentrații circulante care includ ED<sub>50</sub> cu o toxicitate neînsemnată sau cu lipsă de toxicitate. În acest diapazon doza poate varia în funcție de forma de dozare a preparatului utilizată și de calea de administrare.

55 În următoarea variantă de realizare, agentul terapeutic suplimentar se administrează unui subiect în asociere cu un anticorp anti-TIGIT sau cu un fragment al acestuia de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6), în conformitate cu Physicians' Desk Reference 2003 (Thomson Healthcare, ediția a 57-ea (1 noiembrie 2002)). Modul de administrare poate varia. Căile de administrare includ administrarea orală, rectală,

transmucozală, intestinală, parenterală; intramusculară, subcutanată, intradermică, intramedulară, intratecală, intraventriculară directă, intravenoasă, intraperitoneală, intranasală, intraoculară, inhalare, insuflare, topică, cutanată, transdermică sau intraarterială.

5 În variante particulare de realizare, anticorpii anti-TIGIT sau fragmentele acestora de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 și versiunile umanizate ale acestora), pot fi administrați pe cale invazivă, cum ar fi prin injectare. În alte variante de realizare a invenției, anticorpii anti-TIGIT sau fragmentul acestuia de legare a antigenului, sau compoziția farmaceutică a acestuia, se administrează intravenos, subcutanat, intramuscular, intraarterial, intratumoral sau prin inhalare, sub formă de aerosol. Administrarea pe căi non-  
10 invazive (de exemplu, pe cale orală, de exemplu, în pastile, capsule sau comprimate) face parte, de asemenea, din volumul invenției solicitate.

Prezenta invenție se referă la un recipient (de exemplu, un flacon din plastic sau din sticlă, de exemplu, cu capac sau cu coloană cromatografică, ac cu gaură sau cilindru de seringă) care cuprinde oricare dintre anticorpii sau fragmentele de legare a antigenului, conform invenției (de  
15 exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 și versiunile umanizate ale acestora), sau o compoziție farmaceutică a acestora. Prezenta invenție se referă, de asemenea, la un dispozitiv de injectare cuprinzând oricare dintre anticorpii sau fragmentele de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 și versiunile umanizate ale acestora), sau o compoziție farmaceutică a acestora. Dispozitivul de injectare prezintă un dispozitiv care introduce o  
20 substanță în organismul unui pacient pe cale parenterală, de exemplu, intramusculară, subcutanată sau intravenoasă. De exemplu, un dispozitiv de injectare poate fi o seringă (de exemplu, pre-umplută cu compoziția farmaceutică, cum ar fi un auto-injector), care, de exemplu, include un cilindru sau un balon pentru menținerea fluidului ce urmează să fie injectat (de exemplu, anticorp sau fragment, sau o compoziție farmaceutică a acestuia), un ac pentru  
25 străpungerea pielii și/sau a vaselor de sânge pentru injectarea fluidului; și un piston pentru împingerea fluidului din cilindru prin gaura acului. Într-una dintre variantele de realizare a invenției, dispozitivul pentru injecție, care cuprinde un anticorp sau un fragment al acestuia de legare a antigenului, conform prezentei invenții, sau o compoziție farmaceutică a acestuia, prezintă un dispozitiv de administrare intravenoasă (i/v). Un astfel de dispozitiv conține anticorpii sau fragmentul acestuia, sau o compoziție farmaceutică a acestuia, într-o canulă sau  
30 un trocar/ac, cu posibilitatea de a fi fixate la un tub care poate fi unit la un pachet sau un rezervor de menținere a fluidului (de exemplu, o soluție salină, sau o soluție Ringer-lactat cuprinzând NaCl, lactat de sodiu, KCl, CaCl<sub>2</sub> și, în mod opțional, incluzând glucoză), introduse în organismul pacientului prin canulă sau trocar/ac. Anticorpii sau fragmentul, sau compoziția farmaceutică a acestuia, poate fi, într-un exemplu de realizare a invenției, introdus în dispozitiv după introducerea trocarului și a canulei în vena subiectului și trocarul este îndepărtat din canula  
35 introdusă. Dispozitivul i/v poate, de exemplu, să fie introdus în vena periferică (de exemplu, în mână sau umăr); în vena cavă superioară sau vena cavă inferioară, sau în atriul drept al inimii (de exemplu, un cateter intravenos central); sau în vena subclavie, jugulară internă sau femurală și, de exemplu, dispozitivul se avansează în direcția inimii până când acesta ajunge la vena cavă  
40 superioară sau la atriul drept (de exemplu, cateterul venos central). Într-una dintre variantele de realizare a invenției, dispozitivul pentru injecții prezintă un auto-injector; un injector cu jet sau o pompă de perfuzie externă. În injectorul cu jet se utilizează un jet subțire de lichid la o presiune înaltă care penetrează epiderma pentru a introduce anticorpii sau fragmentul, sau compoziția farmaceutică a acestuia, în organismul pacientului. Pompele externe de perfuzie constituie  
45 dispozitive medicale care eliberează anticorpii sau fragmentul, sau compoziția farmaceutică a acestuia, în organismul pacientului în cantități controlate. Pompele de perfuzie externă pot fi acționate în mod electric sau mecanic. Diferite pompe funcționează în mod diferit, de exemplu, pompa cu seringă menține lichidul în rezervorul seringii și un piston mobil controlează distribuția lichidului, pompa elastomer menține lichidul în rezervorul unui balon elastic și presiunea pereților elastici ai balonului conduce eliberarea lichidului. Într-o pompă peristaltică, un set de role efectuează compresia pe lungimea tubului flexibil, împingând fluidul înainte. Într-o pompă multi-canal, lichidele pot fi eliberate din mai multe rezervoare, cu diferite viteze.

50 Compozițiile farmaceutice, dezvăluite în prezenta descriere, pot fi, de asemenea, administrate prin intermediul unui dispozitiv de injectare hipodermică fără ac; cum sunt dispozitivele descrise în brevetele US 6620135; US 6096002; US 5399163; US 5383851; US 5312335; US 5064413; US 4941880; US 4790824 sau US 4596556. Astfel de dispozitive fără ace, care conțin o compoziție farmaceutică, sunt, de asemenea, parte a prezentei invenții. Compozițiile farmaceutice, descrise în documentul de față, pot fi, de asemenea, administrate prin

perfuzie. Exemplele de implanturi și module pentru administrarea compozițiilor farmaceutice bine cunoscute includ exemplele, descrise în brevetul US nr. 4487603, în care este descrisă o pompă implantabilă pentru microperfuzie de eliberare a preparatului farmaceutic cu o viteză controlată; brevetul US 4447233, în care este descrisă o pompă de perfuzie a medicamentului pentru administrarea preparatului la o viteză de perfuzare controlată; brevetul US 4447224, în care este descris un aparat implantabil de perfuzie cu debit variabil pentru eliberarea continuă a preparatului; brevetul US 4439196, în care este descris un sistem osmotic de administrare a medicamentului având compartimente cu mai multe camere. Specialiștilor în domeniul de referință le sunt bine cunoscute și multe alte implanturi, sisteme de administrare și module similare, și cele care cuprind compozițiile farmaceutice, conform prezentei invenții, sunt parte a invenției de față

Ca alternativă, se poate administra anticorpul anti-TIGIT sau fragmentul de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 sau versiunile umanizate ale acestora), în mod local și nu sistemic, de exemplu, prin injectarea anticorpului sau fragmentului direct în tumoare, de exemplu, într-o tumoare TIGIT<sup>+</sup>. Totodată, se poate administra anticorpul sau fragmentul într-un sistem-țintă de eliberare a medicamentului, de exemplu, într-un lipozom acoperit cu un anticorp tisular-specific, direcționat, de exemplu, spre o tumoare TIGIT<sup>+</sup> de exemplu, caracterizată printr-o imunopatologie. Lipozomii pot fi direcționați către țesutul afectat și absorbiți în mod selectiv de către țesutul afectat. Astfel de procedee și de lipozomi constituie o parte din prezenta invenție.

Regimul de administrare depinde de mai mulți factori, inclusiv de viteza de rotație a anticorpului terapeutic sau a fragmentului de legare a antigenului, în ser sau în țesut, de nivelul simptomelor, de imunogenitatea anticorpului terapeutic și de accesibilitatea celulelor țintă în matricea biologică. În mod preferabil, regimul de administrare asigură o eliberare unei cantități suficiente de anticorp sau de fragment terapeutic pentru a asigura un efect de îmbunătățire a stării preconizate a afecțiunii, minimizând simultan efectele secundare nedorite. În mod corespunzător, cantitatea de preparat biologic eliberat depinde parțial de anticorpul terapeutic concret și de severitatea afecțiunii care este tratată. Sunt disponibile instrucțiuni privind selectarea unor doze adecvate de anticorpi terapeutici sau de fragmente ale acestora (a se vedea, de exemplu, Wawrzynczak. Antibody Therapy, Bios. Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK, 1996; Kresina (ed.). Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis, Marcel Dekker, New York, NY, 1991; Bach (ed.). Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases, Marcel Dekker, New York, NY, 1993; Baert, și colab. New Engl. J. Med., no 348, 2003, p. 601-608; Milgrom și colab. New Engl. J. Med., no 341, 1999, p. 1966-1973; Slamon și colab. New Engl. J. Med., no 344, 2001, p. 783-792; Beniaminovitz și colab. New Engl. J. Med., no 342, 2000, p. 613-619; Ghosh și colab. New Engl. J. Med., no 348, 2003, p. 24-32; Lipsky și colab. New Engl. J. Med., no 343, 2000, p. 1594-1602).

Determinarea dozei adecvate este făcută de către clinician, de exemplu, utilizând parametri sau factori cunoscuți sau suspecți în domeniul de referință, care influențează tratamentul. De regulă, doza începe cu o cantitate ceva mai mică decât doza optimă și în continuare aceasta este mărită prin pași mici, până când se ajunge la efectul dorit sau efectul optimal în raport cu oricare efecte secundare negative. Măsurările diagnostice importante includ măsurarea simptomelor, de exemplu, a inflamației sau nivelul de producere a citokinelor inflamatorii. De regulă, este de dorit ca preparatul biologic utilizat să provină de la aceeași specie ca și animalul destinat tratamentului, minimizând, astfel, orice răspuns imun la reactivul respectiv. În cazul subiecților umani, de exemplu, poate fi dezirabilă folosirea anticorpilor umanizați și complet umani.

Anticorpii sau fragmentele acestora de legare a antigenului, dezvăluiți în documentul de față (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 și versiunile umanizate ale acestora), pot fi furnizați prin infuzie continuă sau prin doze administrate, de exemplu, zilnic, de 1-7 ori pe săptămână, săptămânal, o dată la două săptămâni, lunar, o dată la două luni, trimestrial, semestrial, anual etc. Dozele pot fi administrate, de exemplu, intravenos, subcutanat, local, oral, nazal, rectal, intramuscular, intracerebral, intraspinal sau prin inhalare. Doza săptămânală totală constituie, de regulă, cel puțin 0,05 μg/kg greutate corporală, mai frecvent cel puțin 0,2 μg/kg, 0,5 μg/kg, 1 μg/kg, 10 μg/kg, 100 μg/kg, 0,25 mg/kg, 1,0 mg/kg, 2,0 mg/kg, 5,0 mg/ml, 10 mg/kg, 25 mg/kg, 50 mg/kg sau mai mare (a se vedea, de exemplu, Yang, și colab. New Engl. J. Med., no 349, 2003, p. 427-434; Herold, și colab. New Engl. J. Med., no 346, 2002, p. 1692-1698; Liu, și colab. J. Neural. Neurosurg. Psych., no 67, 1999, p. 451-456; Portielji, și colab. Cancer Immunol. Immunother., no 52, 2003, p. 151-144). Dozele pot fi, de asemenea, furnizate pentru a

se obține concentrația predeterminată dorită a anticorpului anti-TIGIT în serul subiectului, cum ar fi de 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100, 300 µg/ml sau mai mult. În alte exemple de realizare, un anticorp anti-TIGIT, conform prezentei invenții, este administrat, de exemplu, subcutanat sau intravenos, în baza administrării săptămânale, o dată la două săptămâni, „la fiecare 4 săptămâni”, o dată în lună, o dată la două luni sau o dată în trimestru a câte 10, 20, 50, 80, 100, 200, 500, 1000 sau 2500 mg/subiect.

Așa cum este utilizat în descrierea de față, termenul „cantitate eficientă” se referă la o cantitate dintr-un anti-TIGIT sau un fragment al acestuia de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6 umanizat sau 28H5 umanizat), care, atunci când este administrat separat sau în combinație cu un agent terapeutic suplimentar într-o celulă, țesut sau subiect, se dovedește a fi eficientă pentru a produce o ameliorare măsurabilă a unui sau a mai multor simptome de boală, de exemplu, a cancerului sau a progresiei cancerului. Totodată, o doză eficientă se referă la cantitatea de anticorp sau de fragment suficientă pentru a avea ca rezultat cel puțin ameliorarea parțială a simptomelor, de exemplu, contracția sau eliminarea tumorii, lipsa creșterii tumorii, mărirea timpului de supraviețuire. Atunci când este utilizat pentru un ingredient activ individual, administrat de sine stătător, doza eficientă se referă anume la acel ingredient. Atunci când este aplicat pentru o combinație, doza eficientă se referă la cantitățile combinate de ingrediente active, indiferent de faptul dacă sunt administrate în combinație, succesiv sau simultan, care au ca rezultat un efect terapeutic. O cantitate eficientă dintr-un preparat terapeutic are ca rezultat o ameliorare a unei măsurări diagnostice sau a unui parametru cu cel puțin 10%; de regulă, cu cel puțin 20%; preferabil, cu cel puțin aproximativ 30%; mai preferabil, cu cel puțin 40% și cel mai preferabil, cu cel puțin 50%. De asemenea, o cantitate eficientă poate conduce la o îmbunătățire a unui criteriu subiectiv, în cazurile în care criteriile subiective sunt folosite pentru a evalua severitatea bolii.

#### Kituri

În continuare, sunt propuse kituri cuprinzând unul sau mai multe componente care includ, dar nu sunt limitate la acestea, un anticorp anti-TIGIT sau un fragment de legare a antigenului, așa cum este discutat în documentul de față (de exemplu, 14A6 umanizat sau 28H5 umanizat, sau 31C6 umanizat), în asociere cu unul sau mai multe componente suplimentare incluzând, dar fără a se limita la acestea, un purtător farmaceutic acceptabil și/sau un agent terapeutic, așa cum se discută în prezentul document. Anticorpul sau fragmentul și/sau agentul terapeutic pot fi exprimate sub formă de compoziție pură sau în combinație cu un purtător farmaceutic acceptabil într-o compoziție farmaceutică.

Intr-o variantă de realizare, kitul cuprinde un anticorp anti-TIGIT sau un fragment al acestuia de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6 umanizat sau 28H5 umanizat, sau 31C6 umanizat), sau compoziția farmaceutică a acestora într-un container (de exemplu, într-un flacon steril de sticlă sau de plastic) și compoziția farmaceutică a acestora și/sau un agent terapeutic într-un alt container (de exemplu, într-un flacon steril de sticlă sau de plastic).

Intr-o altă variantă de realizare, kitul cuprinde o combinație conform invenției, incluzând un anticorp anti-TIGIT sau un fragment al acestuia de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6 umanizat sau 28H5 umanizat, sau 31C6 umanizat), împreună cu un purtător acceptabil farmaceutic, în mod opțional, în combinație cu unul sau cu mai mulți agenți terapeutici formulați împreună, opțional, într-o compoziție farmaceutică într-un container comun.

Dacă kitul include o compoziție farmaceutică pentru administrare parenterală la un subiect, kitul poate include un dispozitiv pentru efectuarea unei atare administrări. De exemplu, kitul poate include unul sau mai multe ace hipodermice sau alte dispozitive pentru injecție, așa cum s-a indicat mai sus.

Kitul poate include un prospect conținând informații referitoare la compozițiile farmaceutice și formele posologice din kit. De regulă, o asemenea informație ajută pacienților și medicilor la utilizarea eficientă și în condiții de siguranță a compozițiilor farmaceutice și formelor posologice incluse în kit. De exemplu, în prospectul anexat pot fi furnizate următoarele informații referitoare la combinația conform invenției: farmacocinetice, farmacodinamice, studiile clinice, parametrii de eficacitate, indicațiile și modul de utilizare, contraindicațiile, atenționările, precauțiile, reacțiile adverse, supradozarea, dozarea și administrarea corectă, condițiile corespunzătoare de păstrare, referințe, informații despre producător/distribuitor și informații referitoare la brevete.

#### Kituri pentru detectare și kituri terapeutice

Pentru comoditate, în kit poate fi inclus un anticorp anti-TIGIT sau un fragment al acestuia de legare a antigenului, conform invenției (de exemplu, 14A6, 28H5, 31C6 sau versiunile umanizate ale acestora), și anume, o combinație ambalată de reactivi în cantități predeterminate cu instrucțiuni pentru realizarea testului de diagnostic sau de detectare. În cazul în care anticorpul sau fragmentul este marcat cu ajutorul unei enzime, kitul poate include substraturile și co-factorii necesari pentru enzimă (de exemplu, un precursor de substrat care asigură cromoforul sau fluoroforul detectabil). Totodată, pot fi incluși și alți aditivi, cum ar fi stabilizatori, tamponi (de exemplu, tamponul de blocare sau tamponul pentru liză) și altele similare. Pentru a asigura concentrațiile reactivilor din soluție, care optimizează substanțial sensibilitatea testului, cantitățile relative ale diferitor reactivi pot fi modificate. În particular, reactivii pot fi furnizați sub formă de pulberi uscate, de regulă, liofilizate, inclusiv excipienți care, la dizolvare, asigură soluția de reactivi având concentrația corespunzătoare.

De asemenea, sunt prezentați reactivi și kituri pentru diagnostic sau detectare care cuprind unul sau mai mulți astfel de reactivi pentru utilizare într-o varietate de teste de detectare, incluzând, de exemplu, teste imunologice, cum ar fi ELISA (de tip „sandwich” sau de format competitiv). Componentele kitului pot fi pre-legate la un substrat solid sau pot fi aplicate pe suprafața unui substrat solid atunci când kitul este utilizat. În unele variante de realizare a invenției, mijloacele de generare a semnalului pot fi furnizate pre-legate cu un anticorp sau un fragment al invenției sau pot necesita înainte de utilizare o combinație cu unul sau cu mai multe componente, de exemplu, tamponi, conjugați anticorp-enzimă, substraturi pentru enzime sau altele similare. Kiturile pot include, de asemenea, reactivi suplimentari, de exemplu, reactivi de blocare pentru a reduce legarea nespecifică cu suprafața fazei solide, reactivi pentru spălare, substraturi pentru enzime și altele similare. Suprafața fazei solide poate avea forma unui tub, unei granule, unei microplăci de titrare, unei microsferă sau altor materiale, adecvate pentru imobilizarea proteinelor, peptidelor sau polipeptidelor. În unele aspecte particulare, o enzimă care catalizează formarea unui produs chemiluminescent sau cromogenic, sau reducerea unui substrat chemiluminescent sau cromogen constituie o componentă a mijloacelor de obținere a semnalului. Astfel de enzime sunt bine cunoscute în domeniul de referință. Kiturile pot cuprinde oricare dintre agenții de legare și reactivii pentru detectare, descriși în prezenta invenție. În mod opțional, kitul poate cuprinde, de asemenea, instrucțiuni pentru realizarea procedurilor conform invenției.

Este prezentat, de asemenea, un kit care cuprinde un anticorp anti-TIGIT (de exemplu, un anticorp umanizat) sau un fragment al acestuia de legare a antigenului, ambalat într-un container, cum ar fi un flacon sau o butelie, și care cuprinde suplimentar un marcaj aplicat pe container sau ambalat împreună cu acesta, marcajul descriind conținutul containerului și furnizând indicații și/sau instrucțiuni privind utilizarea conținutului containerului pentru tratarea unei sau a mai multor stări patologice, așa cum este descris în documentul de față.

Într-un aspect, kitul servește la tratarea tumorii maligne și cuprinde un anticorp anti-TIGIT (de exemplu, un anticorp umanizat) sau un fragment al acestuia de legare a antigenului și un agent terapeutic suplimentar sau un vaccin. Kitul poate include, în mod opțional, o seringă pentru administrare parenterală, de exemplu, intravenoasă. Într-un alt aspect, kitul cuprinde un anticorp anti-TIGIT (de exemplu, un anticorp umanizat) sau un fragment al acestuia de legare a antigenului și un marcaj atașat sau ambalat împreună cu containerul, descriind utilizarea anticorpului sau a fragmentului cu vaccinul sau cu agentul terapeutic suplimentar. În următorul aspect, kitul cuprinde vaccinul sau un agent terapeutic suplimentar și un marcaj atașat sau ambalat împreună cu recipientul, descriind utilizarea vaccinului sau a agentului terapeutic suplimentar cu anticorpul anti-TIGIT sau cu fragmentul acestuia. În anumite variante de realizare, anticorpul anti-TIGIT și vaccinul sau agentul terapeutic suplimentar se află în flacoane separate sau sunt combinate împreună în una și aceeași compoziție farmaceutică.

Așa cum s-a indicat mai sus în secțiunea terapie combinată, administrarea concomitentă a doi agenți terapeutici nu impune ca agenții să fie administrați simultan sau prin unul și același procedeu, cu condiția că există o suprapunere a perioadelor de timp în care agenții își exercită efectul lor terapeutic. O administrare simultană sau secvențială, precum și administrarea în zile sau săptămâni diferite, este avută în vedere.

Pot fi obținute, de asemenea, kiturile terapeutice și de detectare, descrise în documentul de față, care conțin cel puțin unul dintre anticorpi, o peptidă, un fragment de legare a antigenului sau o polinucleotidă, descrise în documentul de față, și instrucțiuni pentru utilizarea compoziției

in calitate de reactiv de detectare sau agent terapeutic. Containerele utilizate in astfel de kituri pot cuprinde, in mod obișnuit, cel puțin un flacon, o epruvetă, o fiolă, o butelie, o seringă sau un alt recipient adecvat, în care pot fi amplasate una sau mai multe dintre compoziția(compozițiile) de detectare și/sau compoziția(compozițiile) terapeutice și, în mod preferabil, porționate în modul corespunzător în alicote. În cazul în care este prevăzut și un al doilea agent terapeutic, kitul poate conține, de asemenea, un al doilea recipient distinct, în care poate fi amplasată această a doua compoziție de detectare și/sau compoziție terapeutică. În mod alternativ, pot fi obținuți mai mulți compuși într-o singură compoziție farmaceutică și pot fi ambalați într-un singur recipient, cum ar fi un flacon, o fiolă, o seringă, o butelie sau un alt recipient unic corespunzător. Kiturile descrise în documentul de față pot include, de regulă, un mijloc de păstrare a flaconului (flacoanelor) în stare închisă pentru vânzare comercială, cum ar fi, de exemplu, recipiente din plastic, fabricate prin turnare sau prin fasonare cu bombare și întindere, în care sunt ținute flacoanele în cauză. În cazul în care kitul include un radiomarker, un marcaj cromogen, fluorigenic sau un alt tip de marcaj detectabil, sau mijloace de detectare, agentul de marcarea fie că poate fi furnizat în același recipient ca și însăși compoziția de detectare sau compoziția terapeutică, fie că, în mod alternativ, poate fi plasat în cel de-al doilea recipient, în care poate fi plasată această a doua compoziție și divizată în alicote. Ca alternativă, reactivul de detectare și marcajul pot fi obținute în recipiente separate și în cele mai multe cazuri kitul poate include, de asemenea, în mod tipic, un mijloc de păstrare a flaconului (flacoanelor) în stare închisă pentru vânzare comercială și/sau ambalare și livrare comode.

Invenția de față prezintă, de asemenea, un dispozitiv sau aparat pentru efectuarea procedeele de detectare sau monitorizare, descrise în documentul de față. Un astfel de aparat poate include o cameră sau o eprubetă în care poate fi plasată proba, un sistem de imbuteliere a lichidelor incluzând, în mod opțional, supape sau pompe pentru direcționarea fluxului probei prin dispozitiv, în mod opțional, poate include filtre pentru a separa plasma sau serul de sânge, camere de masaj pentru adăugarea agenților de legare sau a reactivilor de detectare și, în mod opțional, un dispozitiv de detecție pentru identificarea cantității de marker detectabil, legat la imunocomplexul agentului de legare. Fluxul probei poate fi pasiv (de exemplu, prin forțe capilare, hidrostatice sau prin alte forțe care nu necesită manipulări ulterioare ale dispozitivului după aplicarea probei) sau activ (de exemplu, prin aplicarea forței generate de pompe mecanice, pompe electroosmotice, forței centrifuge sau prin presiunea ridicată a aerului), sau printr-o combinație de forțe active și pasive.

În alte variante de materializare a prezentei invenții sunt prezentate, de asemenea, un procesor, o memorie care poate fi citită de calculator și un flux de lucru standard, stocat în memoria informatizată și adaptat pentru a fi executat de procesor pentru efectuarea oricăruia dintre procedeele descrise în documentul de față. Exemplele de sisteme de calcul potrivite, medii și/sau configurații includ calculatoare personale, calculatoare server, dispozitive portabile sau laptop-uri, sisteme multiprocesor, sisteme bazate pe microprocesoare, set top boxe pentru TV, aparate electronice de consum programabile, PC-uri de rețea, minicalculatoare, calculatoare mainframe, medii de aplicații distribuite, care conțin oricare dintre sistemele sau dispozitivele menționate mai sus sau oricare alte sisteme, cunoscute în domeniul de referință.

#### Procedee generale

Procedeele standard ale biologiei moleculare sunt descrise la Sambrook, Fritsch și Maniatis (1982 și 1989, ediția a 2-a, 2001, ediția a 3-a) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Sambrook și Russell. Molecular Cloning, ediția a 3-a, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY., 2001; Wu. Recombinant DNA, vol. 217, 1993, Academic Press, San Diego, CA.). Procedeele standard sunt prezentate, de asemenea, la Ausbel, și colab. Current Protocols in Molecular Biology, vol.1-4, 2001, John Wiley și Sons, Inc. New York, NY, în care este descrisă clonarea în celule bacteriene și mutagenza ADN-ului (vol. 1), clonarea în celule de mamifere și drojdie (vol. 2), glicoconjugatele și exprimarea proteinei (vol. 3), și bioinformatica (vol. 4).

Sunt descrise procedeele de purificare a proteinelor, inclusiv imunoprecipitarea, cromatografia, electroforeza, centrifugarea și cristalizarea (Coligan, și colab. Current Protocols in Protein Science, vol. 1, John Wiley și Sons, Inc., New York, 2000). Sunt descrise analiza chimică, modificarea chimică, modificarea post-translațională, producerea proteinelor de fuziune, glicozilarea proteinelor (a se vedea, de exemplu, Coligan, și colab. Current Protocols in Protein Science, vol. 2, John Wiley și Sons, Inc., New York, 2000; Ausubel, și colab. Current Protocols in Molecular Biology, vol. 3, John Wiley și Sons, Inc., New York, NY, 2001, p.

- 16.0.5-16.22.17; Sigma-Aldrich, Co. Products for Life Science Research, St. Louis, MO, 2001, p. 45-89; Amersham Pharmacia Biotech BioDirectory, Piscataway, N.J., 2001, pag. 384-391). Sunt descrise obținerea, purificarea și fragmentarea anticorpilor policlonali și monoclonali (Coligan, și colab. *Current Protocols in Immunology*, vol. 1, John Wiley și Sons, Inc., New York, 2001; Harlow și Lane. *Using Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1999; Harlow și Lane, supra). Sunt disponibile procedee standard pentru caracterizarea interacțiunilor ligand/receptorilor (a se vedea, de exemplu, Coligan, și colab. *Current Protocols in Immunology*, vol. 4, John Wiley, Inc., New York, 2001).
- Anticorpii monoclonali, policlonali și umanizați pot fi obținuți (a se vedea, de exemplu, Sheperd și Dean (ed.). *Monoclonal Antibodies*, Oxford Univ. Press, New York, NY, 2000; Kontermann și Dubel (ed.). *Antibody Engineering*, Springer-Verlag, New York, 2001; Harlow și Lane. *Antibodies A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1988, p. 139-243; Carpenter, și colab. *J. Immunol.* 165, 2000, p. 6205; He, și colab. *J. Immunol.* 160, 1998, p. 1029; Tang, și colab. *J. Biol. Chem.* 274, 1999, p. 27371-27378; Baca, și colab. *J. Biol. Chem.* 272, 1997, p. 10678-10684; Chothia, și colab. *Nature* 342, 1989, p. 877-883; Foote și Winter *J. Mol. Biol.* 224, 1992, p. 487-499; US 6329511).
- O alternativă pentru umanizarea anticorpilor este utilizarea băncilor de anticorpi umani, expuși pe fagi, sau a băncilor de anticorpi umani în șoareci transgenici (Vaughan, și colab. *Nature Biotechnol.* 14, 1996, p. 309-314; Barbas (1995) *Nature Medicine* 1, p. 837-839; Mendez, și colab. *Nature Genetics* 15, 1997, p. 146-156; Hoogenboom, și Chames *Immunol. Today* 21, 2000, p. 371-377; Barbas, și colab. *Phage Display: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001; Kay, și colab. *Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual*, Academic Press, San Diego, CA, 1996; de Bruin, și colab. *Nature Biotechnol.* 17, 1999, p. 397-399).
- Sunt descriși anticorpi monocatenari și diacorpi (a se vedea, de exemplu, Malecki, și colab. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 2002, p. 213-218; Conrath, și colab. *J. Biol. Chem.* 276, 2001, p. 7346-7350; Desmyter, și colab. *J. Biol. Chem.* 276, 2001, p. 26285-26290; Hudson, și Kortt. *J. Immunol. Methods* 231, 1999, p. 177-189; și US 4.946.778). Sunt prezentați anticorpi bifuncționali (a se vedea, de exemplu, Mack, și colab. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 1995, p. 7021-7025; Carter. *J. Immunol. Methods* 248, 2001, p. 7-15; Volkel, și colab. *Protein Engineering* 14, 2001, p. 815-823; Segal, și colab. *J. Immunol. Methods* 248, 2001, p. 1-6; Brennan, și colab. *Science* 229, 1985, p. 81-83; Raso, și colab. *J. Biol. Chem.* 272, 1997, p. 27623; Morrison. *Science* 229, 1985, p. 1202-1207; Traunecker, și colab. *EMBO J.* 10, 1991, p. 3655-3659; US 5932448, US 5532210 și US 6129914).
- De asemenea, sunt prezentați anticorpi bispecfici (a se vedea, de exemplu, Azzoni, și colab. *J. Immunol.* 161, 1998, p. 3493; Kita, și colab. *J. Immunol.* 162, 1999, p. 6901; Merchant, și colab. *J. Biol. Chem.* 274, 2000, p. 9115; Pandey, și colab. *J. Biol. Chem.* 275, 2000, p. 38633; Zheng, și colab. *J. Biol. Chem.* 276, 2001, p. 12999; Propst, și colab. *J. Immunol.* 165, 2000, p. 2214; Long. *Ann. Rev. Immunol.* 17, 1999, p. 875).
- Purificarea antigenului nu este necesară pentru obținerea de anticorpi. Animalele pot fi imunizate cu celule care poartă antigenul ce prezintă interes. Ulterior, splenocitele pot fi izolate de la animale imunizate și splenocitele pot fi fuzionate cu o linie de celule de mielom pentru a obține un hibridom (a se vedea, de exemplu, Meyaard, și colab. *Immunity* 7, 1997, p. 283-290; Wright, și colab. *Immunity* 13, 2000, p. 233-242; Preston, și colab., supra; Kaithamana, și colab. *J. Immunol.* 163, 1999, p. 5157-5164).
- Anticorpii pot fi conjugați, de exemplu, cu molecule mici de preparat medicamentos, cu enzime, lipozomi, polietilenglicol (PEG). Anticorpii pot fi utilizați în scopuri terapeutice, de diagnostic, în kituri sau în alte scopuri și includ anticorpi legați, de exemplu, cu coloranți, radioizotopi, enzime sau metale, de exemplu, aur coloidal (a se vedea, de exemplu, Le Doussal și colab. *J. Immunol.* 146, 1991, p. 169-175; Gibellini și colab. *J. Immunol.* 160, 1998, p. 3891-3898; Hsing și Bishop. *J. Immunol.* 162, 1999, p. 2804-2811; Everts și colab. *J. Immunol.* 168, 2002, p. 883-889).
- Sunt disponibile procedee de citometrie în flux incluzând sortarea celulelor activată prin fluorescență (FACS), (a se vedea, de exemplu, Owens și colab. *Flow Cytometry Principles for Clinical Laboratory Practice*, John Wiley și Sons, Hoboken, NJ, 1994; Givan. *Flow Cytometry*, ed. a 2-a; Wiley-Liss, Hoboken, NJ, 2001; Shapiro. *Practical Flow Cytometry*, John Wiley și Sons, Hoboken, NJ, 2003). Sunt disponibili reactivi fluorescenți, adecvați pentru modificarea acizilor nucleici, incluzând primeri și sonde de acid nucleic, polipeptide și anticorpi pentru

utilizare, de exemplu, în calitate de reactivi pentru diagnostic (Molecular Probes Catalogue, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, 2003; Sigma-Aldrich Catalogue, St. Louis, MO, 2003).

Sunt descrise procedee standard de histologie a sistemului imunitar (a se vedea, de exemplu, Muller Harmelink (ed.) Human Thymus: Histopathology and Pathology, Springer Verlag, New York, NY, 1986; Hiatt și colab. Color Atlas of Histology, Lippincott, Williams și Wilkins, Phila, PA, 2000; Louis și colab. Basic Histology: Text and Atlas, McGraw-Hill, New York, NY, 2002).

Sunt disponibile pachete software și baze de date pentru a determina, de exemplu, fragmentele antigenice, secvențele lider, pliarea proteine, domeniile funcționale, situsurile de glicozilare și aliniamentele secvențelor (a se vedea, de exemplu, GenBank, Vector NTI® Suite (Informax, Inc., Bethesda, Md) ; GCG Wisconsin Package (Accelrys, Inc., San Diego, CA); DeCypher® (TimeLogic Corp., Crystal Bay, Nevada); Menne și colab. Bioinformatics 16, 2000, p. 741-742; Menne și colab. Bioinformatics Applications Note 16, 2000, p. 741-742; Wren și colab. Comput. Methods Programs Biomed. 68, 2002, p. 177-181; von Heijne. Eur. J. Biochem. 133, 1983, p. 17-21; von Heijne. Nucleic Acids Res. 14, 1986, p. 4683-4690).

#### Exemplul 1

##### Obținerea anticorpilor anti-hTIGIT de șobolan și șoarece

Pentru a obține anticorpi anti-TIGIT umani, șobolanii Lewis au fost imunizați cu proteina recombinantă - his-TIGIT uman marcat de le Sino Biologicals Cat. nr. 10917-H08H) - folosind adjuvantul RIBI și o injecție în pernuța tălpii după un program de două ori pe săptămână. Ca alternativă, șoarecii Balb/C au fost imunizați cu proteina recombinantă - TIGIT uman marcat cu Fc uman - folosind adjuvantul RIBI și o injecție în pernuța tălpii după un program de două ori pe săptămână. De la animalele imunizate a fost colectat sânge și au fost determinate titrurile serului pentru legarea cu celulele CHOK1 transfectate de TIGIT uman utilizandu-se un test ELISA pe bază de celule (descriș mai jos). Animalelor cu cele mai înalte titruri li s-a administrat o injecție finală de rapel cu proteină recombinantă și ganglionii limfatici drenați din regiunea popliteală au fost izolați cu patru zile mai târziu. Hibridoamele au fost obținute prin electrofuziunea limfocitelor izolate cu partenerul de fuziune mielomul P3X63-Ag8.653 folosind sistemul de electrofuziune Cytopulse Hybrimmune. Celulele fuzionate au fost însămânțate pe plăci cu 96 de godeuri în DMEM/F12, 15% BCS, HAT, IL-6, supliment OPI și gentamicină.

Supernatanții hibridoamelor au fost testați la legarea celulele CHOK1 care exprimă TIGIT uman și la capacitatea reactivă încrucișată în raport cu celulele CHO care exprimă TIGIT rhesus folosind formatul ELISA pe bază de celule. Celulele CHO-K1 care exprimă TIGIT uman și TIGIT rhesus au fost însămânțate pe plăci de cultură celulară cu 96 de godeuri în 50 μl de DMEM/F12, 10% BCS și gentamicină (mediul CHO-K1). Celulele au fost placate fie la 2x10<sup>4</sup> celule/godeu cu două zile înainte de test, fie la 4x10<sup>4</sup> celule/godeu cu o zi înainte de test. Mediul a fost îndepărtat din godeuri înainte de analiză și au fost adăugate 50 μl de supernatant de hibridom. Supernatanții de hibridom au fost incubati timp de 30...60 min la temperatura camerei și spalați de 3 ori cu PBS/0,05% Tween 20 folosind protocolul de spălare ELISA pe celulele din epuratorul pentru plăcile Biotek EL405x Select CW. Cincizeci de microlitri de anticorp pentru detecție (anticorpu capră anti-IgG șobolan conjugat cu HRP (Southern Biotech cat. nr. 3030-05) sau anticorpu capră anti-IgG șoarece conjugat cu HRP (Southern Biotech cat. nr. 1043-05)), a fost adăugat la o diluție de 1:2000 în mediul CHO-K1 și a fost incubat la temperatura camerei timp de 30...60 min. Plăcile pentru test au fost spălate după cum se descrie mai sus și dezvoltate cu TMB, și reacția a fost stopată cu ajutorul soluției de stopare pentru TMB (KPL cat. nr. 50-85-06) sau cu acid fosforic de 0,1N. Absorbanța a fost determinată la 450 nm...620 nm. Clonele pozitive s-au dovedit apte de a reacționa cu celulele CHO-K1, transfectate atât de TIGIT uman, cât și de TIGIT rhesus, și s-au dovedit a fi negative pentru legarea la celulele parentale CHO-K1. În aceste teste, dacă pentru anticorp apărea legarea cu celulele parentale (netransfectate) CHO-K1; autorii prezentei invenții eliminău acest anticorp din screening ca fiind non-specific pentru TIGIT.

Hibridoamele pozitive au fost subclonate prin diluție limitativă sau subclonate prin placarea hibridoamelor în medii semisolide, și clonele au fost prelevate pe ClonePix® (Genetix). Pentru hibridoamele parentale au fost efectuate două cicluri de subclonare. Subclonele finale au fost crescute în culturi la scară mică, într-un mediu fără ser de producere a hibridoamelor, acestea fiind curățate în vederea obținerii anticorpului purificat pentru caracterizare ulterioară.

Folosind aceste procedee, au fost obținute circa 819 hibridoame.

## Exemplul 2

## Caracterizarea anticorpilor anti-hTIGIT

Supernatanții provenind de la clonele pozitive au fost testați la capacitatea lor de a bloca legarea proteinei CD155-huFc umane recombinante la celulele hTIGIT CHOK1 într-un format ELISA pe bază de celule. Celulele TIGIT-CHO-K1 umane au fost semănate pe plăci cu 96 de godeuri, așa cum este descris mai sus. Mediul a fost îndepărtat de pe plăci și 50  $\mu$ l de supernatant hibridoma au fost incubate cu celule TIGIT-CHO-K1 uman la temperatura de 4°C timp de 30 min. Cincizeci de microlitri de CD155-huFc uman au fost adăugate pe placă până la o concentrație finală de 0,5  $\mu$ g/ml de CD155-huFc uman și incubate timp de 30 min la temperatura de 4°C. Plăcile pentru testare au fost spălate de 3 ori cu PBS/0,05% Tween-20 după cum a fost arătat mai sus. Legarea CD155-huFc uman la celulele hTIGIT-CHOK1 a fost detectată folosind conjugatul-HRP al anticorpului secundar F(ab)'2 de capră anti-IgG uman (Jackson 109-036-098) la o diluție de 1:2000 în mediul CHO-K1. Plăcile au fost dezvoltate folosind TMB și reacția a fost oprită prin intermediul soluției de stopare pentru TMB, după cum a fost descris mai sus, și a fost determinat A450-620 nm.

Un anticorp de șobolan, obținut în conformitate cu procedeul descris mai sus, a fost desemnat ca 14A6 și a fost derivat din clona LB155.14A6.G2.A8. Acest anticorp de șobolan (14A6) aparține de izotipul IgG2/kappa și cuprinde regiunea variabilă a lanțului greu din SECV. ID NR. 7 și regiunea variabilă a lanțului ușor din SECV. ID NR. 8. Anticorpul 14A6 purificat se leagă la TIGIT uman și la TIGIT rhesus, după cum a fost determinat prin testul ELISA pe bază de celule, la celulele CHOK1 TIGIT umane și TIGIT rhesus (Fig. 1), folosind procedeele descrise mai sus. (Un anticorp martor al izotipului nu a prezentat vreo legare (datele nu sunt prezentate). Anticorpul 14A6 purificat poate, de asemenea, bloca interacțiunea dintre hTIGIT și hCD155 utilizând un test de blocare ELISA pe bază de celule (Fig. 3), folosind procedeul, descris mai sus.

Un anticorp de șoarece, obținut în conformitate cu procedeul descris mai sus, este desemnat ca 28H5 și provine din clona TC167.28H5.H5. Acest anticorp de șoarece (28H5) aparține de izotipul IgG1/kappa și cuprinde regiunea variabilă a lanțului greu din SECV. ID NR. 63 și regiunea variabilă a lanțului ușor din SECV. ID NR. 64. Anticorpul 28H5 purificat de asemenea se leagă la TIGIT uman și TIGIT rhesus, după cum s-a determinat după legarea cu celulele CHOK1 TIGIT uman și TIGIT rhesus, cu ajutorul ELISA pe bază de celule (Fig. 2), în conformitate cu procedeele descrise mai sus. Anticorpul 28H5 purificat blochează, de asemenea, interacțiunea dintre hTIGIT și hCD155, utilizând testul de blocare ELISA pe bază de celule (Fig. 3), în conformitate cu procedeul, descris mai sus.

Un alt anticorp de șoarece, obținut în conformitate cu procedeul descris mai sus, a fost desemnat ca 31C6 și provine din clona MEB125.31C6.A1.205. Acest anticorp de șoarece (31C6) se referă la izotipul IgG1/kappa și cuprinde regiunea variabilă a lanțului greu din SECV. ID NR. 94 și regiunea variabilă a lanțului ușor din SECV. ID NR. 95. Anticorpul 31C6 purificat de asemenea se leagă la TIGIT uman și TIGIT rhesus, după cum s-a determinat prin legarea la celulele CHOK1 TIGIT uman și TIGIT rhesus cu ajutorul testului ELISA pe bază de celule (Fig. 4), în conformitate cu procedeele descrise mai sus. Anticorpul 31C6 purificat de asemenea blochează interacțiunea dintre hTIGIT și hCD155 utilizând testul de blocare ELISA pe bază de celule (Fig. 4), în conformitate cu procedeul, descris mai sus.

**Determinarea afinității de legare a anticorpilor anti-TIGIT parental (non-umani) la proteina recombinantă cu TIGIT uman:** Cinetica activității de legare a anticorpilor anti-TIGIT uman 14A6 și 31C6 (obținuți după cum este descris în Exemplul 1) și a anticorpului comercial MBSA43 a fost măsurată prin rezonanță plasmonică de suprafață cu ajutorul sistemului Biacore T200 (Biacore, GE Healthcare, Piscataway, NJ). Aproximativ 5000 PE de anticorp anti-IgG de șoarece, GE Healthcare, număr de catalog BR-1008-38, sau aproximativ 13000 PE specific pentru fragmentul anticorpului de capră IgG anti-Fc gamma de șobolan, Jackson ImmunoResearch, număr de catalog 112-006-071, a fost imobilizat prin reacții chimice de adiție a aminei pe un cip senzor CM5 seria S, număr de catalog BR-1005-30. Fiecare din clonele anticorpului de șoarece anti-TIGIT uman 31C6 și MBSA43 au fost injectate pe suprafețele imobilizate ale anticorpilor imobilizați anti-șoarece la 1  $\mu$ g/ml până la nivelul de captare a 40 RU. Clona anticorpilor de șobolan anti-TIGIT uman 14A6 a fost injectată pe suprafețele anti-corpilor imobilizați anti-șobolan la 1  $\mu$ g/ml până la nivelul de captare a 40 RU. Tamponul HBS-EP + (BR-1006-69) a fost utilizat în calitate de tampon de rulare, cu un debit al fluxului de 30  $\mu$ l/min. Pe suprafețele anticorpilor au fost injectate diferite concentrații de

proteină TIGIT-His uman sau de proteină TIGIT-Fc, variind în diapazonul de la 0,29 nM până la 40 nM, la un debit al fluxului de 45 µl/min. La sfârşitul fiecărui ciclu de injectare a anticorpilor de şoarece anti-TIGIT uman pentru clonele 31C6 şi MBSA43, suprafaţa cipului CM5 seria S a fost regenerată folosind o injecţie de 3 minute de glicină de 10 mM cu pH de 1,7 la debitul fluxului de 10 µl/min. După fiecare ciclu de injectare a anticorpilor de şobolan anti-TIGIT uman, suprafaţa cipului de CM5 seria S a fost regenerată folosind o injecţie de 20 de secunde de glicină de 10 mM cu pH de 1,5, urmată de două injecţii a câte 10 sec de 12,5 mM NaOH, la debitul fluxului de 60 µl/min.

Senzorogramele de legare a subtracţiei de fundal, au fost utilizate pentru analiza constantei vitezei de asociere ( $k_a$ ) şi de disociere ( $k_d$ ) şi a constantei de echilibru a fenomenului de disociere  $K_D$ . Seturile de date rezultate au fost puse în conformitate cu modelul de legare Langmuir 1:1 folosind software-ul de evaluare BIAcore T200 (versiunea 2.0). În Tabelul 3 sunt rezumate afinităţile anticorpilor anti-TIGIT uman pentru proteina TIGIT-His uman şi proteina TIGIT-Fc.

Măsurarea afinităţii anticorpilor anti-TIGIT umani cu proteina TIGIT-His umană şi proteina TIGIT-Fc folosind BIAcore

Tabelul 3

| Clona                       | KD conform BIAcore<br>(TIGIT- his uman)<br>(pM) | KD conform BIAcore<br>(TIGIT- Fc uman)<br>(pM) |
|-----------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| 14A6 (rIgG2a/K)             | 3,09                                            | 3,12                                           |
| 31C6 (mIgG1/K)              | 34,4                                            | 10,9                                           |
| Comparatorul MBSA43 (mIgG1) | 36,3                                            | 16,5                                           |

## Exemplul 3

Analiza activităţii celulelor T *in vitro* pentru anticorpii antagonişti anti-hTIGIT

Printre anticorpii testaţi, pentru aproximativ 352 de anticorpi monoclonali, indicaţi de a bloca legarea CD155-Fc la celulele CHO exprimand hTIGIT, a fost efectuat un screening în vederea determinării capacităţii lor de a spori activitatea celulelor T *in vitro* utilizand testele funcţionale pe bază de celule.

Autorii prezentei invenţii au dezvoltat un test pentru caracterizarea consecinţelor funcţionale ale blocării receptorului TIGIT uman utilizând celulele Jurkat, linia celulară imortalizate de limfocite T umane (clona E6-1; ATCC TIB-152), concepută pentru a supra-exprima TIGIT umane (hTIGIT-Jurkat), care au fost cultivate împreună cu celulele THP-1, linia de celule monocitare umane în prezenţa sau în absenţa unuia dintre liganzii TIGIT, CD155 şi CD112. Celulele hTIGIT-Jurkat, co-cultivate cu celule THP-1 şi stimulate prin intermediul plăcii mAb anti-CD3, produc IL-2, însă atunci când ligandul TIGIT (CD155 sau CD112) era adăugat la co-cultură, nivelurile de IL-2 se reduceau într-un mod dependent de ligand. Tratamentul cu anticorpii care blochează interacţiunea CD155-TIGIT sau CD112-TIGIT, cum ar fi un Ab anti-hTIGIT disponibil comercial, clona MBSA43 (eBioscience Cat. Nr. 12-9500-42), reconstituie producţia de IL-2 în acest test într-o manieră dependentă de doză (Fig. 5).

Plăcile cu fund plat cu 96 de godeuri au fost acoperite cu anticorpii de şoarece anti-CD3 uman (1 µg/ml în PBS; clona HIT3a; BD Pharmingen Cat. Nr. 555336) timp de o noapte la temperatura de 4°C. În ziua următoare, celulele hTIGIT-Jurkat (50000) erau însămânţate pe plăcile pre-acoperite şi erau pre-incubate timp de 30-60 minute cu mAb de concentraţii diferite. Celulele THP-1 (50000) erau adăugate la cultură, apoi fie CD155-Fc (ECD CD155 uman fuzionat cu Fc uman; 1,0 µg/ml), fie CD112-Fc (ECD CD112 uman fuzionat cu Fc uman; 0,5 µg/ml). După incubare timp de 18-24 ore la temperatura de 37°C şi 5,0% de CO<sub>2</sub>, nivelurile de IL-2 erau evaluate în supernatanţii de cultură prin intermediul Meso Scale (kitul MESO cultură de ţesut IL-2 uman: Cat. Nr. K151AHB-2). Tratamentul cu MBSA43 (10 µg/ml) restabileşte IL-2 până la un nivel egal cu cel al celulelor activate hTIGIT Jurkat, cultivate cu THP-1 în absenţa CD155 sau CD112.

După cum se arată în Fig. 5, la titrarea anticorpului anti-hTIGIT, clona 14A6, de la 30 µg/ml până la 0,04 µg/ml, s-a obţinut EC<sub>50</sub> de 0,190 µg/ml comparativ cu MBSA43 de 0,24 µg/ml, folosind testul dat. Clona 14A6 (30 µg/ml) restabileşte nivelul IL-2 până la 82% din MBSA43 (10 µg/ml).

Folosind testul în cauză, în Fig. 5 s-a demonstrat, de asemenea, că, la titrarea anticorpului anti-hTIGIT, clona 28H5, de la 30 µg/ml până la 0,04 µg/ml, s-a obținut EC<sub>50</sub> de 0,24 µg/ml, în raport cu MBSA43 de 0,24 µg/ml.

5 Folosind acest test, în Fig. 6 s-a demonstrat, de asemenea, că, la titrarea anticorpului anti-hTIGIT, clona 31C6, de la 30 µg/ml până la 0,04 µg/ml, s-a obținut EC<sub>50</sub> de 0,14 µg/ml, comparativ cu MBSA43 de 0,24 µg/ml. Clona 31C6 (30 µg/ml) restabilește nivelul IL-2 până la 118% din MBSA43 (10 µg/ml).

10 Folosind testele funcționale pe bază de celule, din cei 352 de anticorpi monoclonali testați, aproximativ 113 au fost capabili de a spori activitatea limfocitelor T *in vitro*.

#### Exemplul 4

Analiza activității celulelor T *in vitro* pentru anticorpii antagoniști anti-hTIGIT

15 În continuare, autorii invenției de față au analizat antagonismul funcțional relativ al TIGIT și restabilirea activării celulelor T și a funcției efectoare folosind o linie primară de celule T umane care exprimă TIGIT endogen atunci când este activat receptorul celulei T (TCR). Linia de celule T umane ale clonei BC4-49 prezintă o clonă CD4+, specifică pentru aloantigenul celulelor T umane, care exprimă TCR, specific pentru moleculele MHC HLA-clasa II, exprimat pe linia celulară EBV transformată, JY (HLA-DR1,4). Linia de celule T umane ale clonei BC4-49 necesită restimularea cu aloantigen la fiecare două săptămâni, folosind celulele stimulatorie JY iradiate (5000 rad), PBMC iradiate (4000 rad), izolate din două straturi leucocitare, și PHA-P (2,5 µg/ml; Sigma), precum și 10 ng/ml de IL-2 umană (R&D) suplimentat la fiecare 3-4 zile după restimulare și extindere. Câteva clone de celule T (BC1-6, BC4-27, BC4-49) au fost analizate prin intermediul PCR și mai apoi prin intermediul citometriei în flux pentru exprimarea relativă a TIGIT în urma stimulării repetate, fiind selectată clona BC4-49, deoarece aceasta

20 posedă cea mai înaltă expresie a TIGIT, comparativ cu alte clone. Expresia relativă și cinetica TIGIT, CD226, CD96 și CD155 au fost monitorizate după stimularea repetată cu celule stimulatorie JY iradiate (5000 rad), cu PBMC și PHA-P iradiate, pentru a evalua cel mai bun timp pentru analiza antagoniștilor mAb privind activitatea antagonistă relativă în raport cu TIGIT. Varful expresiei TIGIT s-a observat peste 3-4 zile după stimularea repetată, în timp ce expresia CD226 și CD96 din aceeași perioadă de timp se micșora. În continuare, expresia TIGIT a scăzut, în timp ce expresia CD226 și CD96 a crescut din nou în ziua a 6-ea după stimularea repetată (Fig. 7). În mod corespunzător, mAb – candidații la rolul de antagoniști ai TIGIT - au fost evaluați după 3-4 zile de la stimularea repetată. Transfectantul JY supraexprimând CD155 umană a fost obținut folosind vectorii retrovirali pMX->huTIGIT în calitate de mijloace pentru

30 supresia răspunsurilor celulelor T ale clonei BC4-47 din biotestul de celule T primare și pentru evaluarea capacității relative a mAb anti-TIGIT de a antagoniza activarea TIGIT prin intermediul CD155 și de a restabili proliferarea celulelor T și IFN $\gamma$  cu trei zile mai târziu.

Testul de celule T primare cu privire la antagonismul relativ al mAb anti-hTIGIT a fost efectuat după cum urmează. Linia celulară CD4+ de celule T umane ale clonei BC4-49 a fost cultivată împreună cu CD155-Fc mAb de blocare, specifice pentru hTIGIT, în diverse concentrații (33, 11, 3,7, 1,2, 0,4 și 0,1 µg/ml) timp de 30 minute și mai apoi erau însemănțate pe plăci cu fundul plat de 96 de godeuri (2x10<sup>4</sup> c/godeu). Transfectanții JY-hCD155, care exprimă aloantigenul și nivelurile ridicate de hCD155, au fost iradiate (5000 rad), spălate și mai apoi adăugate în godeurile conținând celulele T ale clonei BC4-49, tratate cu mAb anti-TIGIT, până

45 la o concentrație finală de 1x10<sup>4</sup> (celule T 2:1: raportul de celule țintă) sau de 5x10<sup>3</sup> (celule T 1:4: raportul de celule țintă) într-un volum total de 200 µl/godeu. Grupele de control nu au inclus tratamentul cu mAb, cultivarea comună cu celule T tratate cu mAb de același izotip, doar celule T și doar celule JY-CD155. După trei sau patru zile de cultivare în comun, supernatanții au fost recoltați pentru cuantificarea cantitativă a citochinelor interferon-gamma (IFN $\gamma$ ), iar celulele T au fost prelucrate timp de 6 ore cu timidină tritiată pentru a evalua proliferarea relativă.

După cum se arată în Figurile 8A și 8B, prelucrarea mAb anti-hTIGIT 14A6, 28H5 și 31C6 a celulelor T ale clonei BC4-49 a condus la restabilirea IFN $\gamma$  și răspunsurilor proliferative, fapt determinat după răspunsurile crescute în comparație cu izotipul și cu celulele T netratate. Anticorpusul MBSA43 disponibil comercial și anticorpii 37D10 și 25G10 (anticorpii anti-TIGIT, obținuți așa cum este descris în Exemplul 1) au prezentat, de asemenea, activitate în testul dat.

55 Creșterea producției de IFN $\gamma$  după prelucrarea 14A6, 28H5 și 31C6 a fost în medie de aproximativ 2 ori.

## Exemplul 5

Activitatea anti-tumorală a anticorpilor anti-TIGIT și anti-PD1 în modelul tumoral animal

Șoareci: Femelele murine BALB/cAnN cu vârsta de aproximativ șapte sau opt săptămâni și greutatea corporală medie de 20 grame au fost obținute de la Taconic Laboratory (Germantown, NY). Hrana convențională pentru animale și apa au fost furnizate ad libitum.

Reactivi-anticorpi: Un anticorp monoclonal al izotipului murin IgG1 anti-PD-1 murin și anticorpul de control al aceluiași izotip au fost obținuți din surse interne sub formă de stocuri congelate (-80°C). Anticorpul de șobolan anti-TIGIT de șoarece (GIGD7) a fost obținut de la eBioscience sub formă de stoc la temperatura de 4°C. Anticorpul de control al izotipului IgG1 prezenta un anticorp monoclonal de șoarece, specific pentru hexonul adenoviral 25. Anticorpul de control al izotipului IgG2a prezenta un anticorp monoclonal de șobolan, specific pentru beta-galactozidază. Izotipul de șoarece IgG1 constituia un izotip omolog de șoarece pentru izotipul uman IgG4.

Componentele reactivilor-anticorpi: Tampoanele compozițiilor erau specifice pentru fiecare anticorp în procesul de stabilizare a proteinelor și prevenire a precipitării. Compozițiile au fost următoarele: mIgG1: 75 mM NaCl, 10 mM fosfat de sodiu, 3% zaharoză, pH 7,3; anti-PD-1: 20 mM acetat de sodiu, 7% zaharoză, pH 5,5; IgG2a de șobolan: 20 mM acetat de sodiu, 9% zaharoză, pH 5,5; și anticorpul anti-TIGIT (GIGD7): PBS pH 7,0.

Obținerea și implantarea liniei de celule tumorale: celule de carcinom de colon CT26 au fost cultivate în mediul RPMI, suplimentat cu ser fetal bovin de 10%, inactivat prin încălzire. Celulele CT26 sub-confluente și log-faza  $3 \times 10^5$  au fost injectate subcutanat (s/c) într-un volum de 100  $\mu$ L RPMI liber de ser în partea dorsală inferioară din dreapta a fiecărui șoarece. Șoarecii au fost mai întâi rași cu mașini electronice în zona care destinată de a fi folosită pentru implantare.

CT-26 prezintă o linie celulară de adenocarcinom colorectal murin singenică pentru tulpina murină BALB/c. CT-26 este un sistem model relevant pentru evaluarea mecanismului de acțiune al anticorpului anti-PD-1, datorită profilului molecular translatabil al acestei tumori după tratamentul cu anticorpul anti-PD-1.

Măsurătorile tumorilor și greutatea corporală: Tumorile au fost măsurate cu o zi înainte de prima doză și de două ori pe săptămână după aceea. Lungimea și lățimea tumorii au fost măsurate utilizând șublere electronice și volumul tumoral era determinat prin formula  $Volumul (mm^3) = 0,5 \times lungimea \times lățimea^2$ , unde lungimea constituie dimensiunea mai mare. Șoarecii au fost cântăriți periodic pentru monitorizarea stării generale de sănătate, precum și pentru a estima doza reală pentru livrare în mg/kg per șoarece, în caz de necesitate. Înainte de tratament, șoarecii au fost cântăriți și au fost măsurate tumorile unor șoareci individuali. Pentru a preveni abaterile, orice valoare atipică în volumul sau greutatea tumorii șoarecilor au fost eliminate, iar șoarecii rămași au fost randomizați în diferite grupuri de tratament cu o dimensiune medie echivalentă a tumorii. Când volumul mediu al tumorii la șoarecii purtători de tumoare CT26 a atins  $\sim 100 mm^3$ , peste aproximativ 7 zile de la implantare, animalele au fost randomizate în grupuri de tratament a câte 10 șoareci și a fost inițiată dozarea. Animalelor le-au fost administrate concentrațiile de dozaj, specificate mai jos.

Prepararea, administrarea și analiza soluțiilor de dozare: Stocurile congelate de anticorpi care urmau să fie testate pe modelul animal au fost dezghețate și transferate în gheață umedă. Pentru a evita congelarea și decongelarea repetate, fiecare flacon cu soluție inițială a fost decongelat o singură dată și distribuite în alicote având volume suficiente pentru o singură utilizare. În acest scop au fost folosite eprubete de polipropilenă cu aderență redusă. Alicotele au fost congelate rapid în gheață uscată și stocate la -80°C. Înainte de fiecare dozare, o alicotă a fost dezghețată, diluată cu un diluant adecvat până la concentrația nominală și administrată imediat. Alicotele soluțiilor pentru dozare au fost congelate rapid și stocate la -80°C până la efectuarea analizelor. Soluțiile pentru dozare au fost evaluate cu ajutorul platformei Meso Scale Discovery (MSD®, Rockville, MD), bazată pe tehnologia multiplex; o combinație de detecție prin electrochimiluminiscentă și imunoteste multiplexate.

Rezultatele tratamentului cu dozarea anticorpilor anti-TIGIT/anti-PD1: Șoarecilor BALB/cAnN purtători de tumoare CT26 le-a fost administrat anticorpul de șobolan anti-TIGIT de șoarece (GIGD7) într-o doză de 20 mg/kg, IP, la fiecare 4 zile, pe parcursul fiecăruia din cele 5 cicluri. Anticorpul PD-1 de șoarece (descriși mai sus) au fost administrat într-o doză de 10 mg/kg, IP, la fiecare 4 zile pe parcursul fiecăruia din cele 5 cicluri. După dozare, animalele au continuat să fie monitorizate și volumele tumorale au fost măsurate până la 36 de zile. Tratamentul a fost început atunci când dimensiunea tumorii a atins în medie  $100 mm^3$  ( $75 mm^3$  -

115 mm<sup>3</sup>). Tumorile au fost măsurate de două ori pe săptămână. După cum demonstrează rezultatele, prezentate în Fig. 9, răspunsul antitumoral mediu în terapia combinată cu antagonistul PD-1 și antagonistul TIGIT a fost mai înalt decât răspunsul antitumoral, observat în monoterapia fie cu anti-PD1 ( $p < 0,05$ ), fie cu anti-TIGIT ( $p < 0,005$ ). Pentru monoterapia cu anti-TIGIT, a fost identificată o inhibare de 21% a creșterii tumorii (TGI) în ziua a 14-ea. Pentru monoterapia cu anti-PD1 a fost identificat TGI de 52% în ziua a 14-ea. Tratamentul combinat a generat 85% de TGI în ziua a 14-ea și a demonstrat 40% cazuri de regresie completă (CR), astfel încât la 4 din 10 șoareci nu a rămas nici o tumoare măsurabilă în ziua a 36-ea. Eficacitatea anti-tumorală cu oricare dintre anticorpii, administrați în calitate de monoterapie, a constituit 0-10% CR.

#### Exemplul 6

##### Umanizarea anticorpilor

Anticorpul 14A6 de șobolan și anticorpul 31C6 de șoarece au fost umanizați folosind procedeele prezentate în descriere. Din anticorpul 14A6 de șobolan au fost construite următoarele lanțuri variabile grele umanizate: SECV. ID NR. 9-24 și SECV. ID NR. 37-47; și au fost construite următoarele lanțuri variabile ușoare umanizate: SECV. ID NR. 25-30 și SECV. ID NR. 48-52. Din anticorpul 31C6 de șoarece au fost construite următoarele lanțuri variabile grele umanizate: SECV. ID NR. 124-129; și au fost construite următoarele lanțuri variabile ușoare umanizate: SECV. ID NR. 130-133.

#### Exemplul 7

##### Efectul izotipului Fc asupra activității antitumorale a anticorpilor anti-TIGIT într-un model tumoral animal

Șoareci: Femelele de șoareci BALB/cAnN cu vârsta de aproximativ șapte sau opt săptămâni și greutatea corporală medie de 20 grame au fost obținute de la Taconic Laboratory (Germantown, NY). Hrana convențională pentru animale și apa au fost furnizate ad libitum.

##### Reactivi-anticorpi:

- Anticorpul de șoarece anti-PD1 de șoarece - subtipul IgG1.
- Anticorpul de șobolan anti-TIGIT de șoarece (18G10) - subtipul IgG1 de șobolan. Acest anticorp este descris în Figuri ca 18G10 parental. Anticorpul 18G10 posedă secvența VH din SECV. ID NR. 136 și secvența VL din SECV. ID NR. 137.
- Anticorpul chimeric de șobolan anti-TIGIT de șoarece (18G10), care cuprinde o regiune Fc de șoarece de subtipul mIgG1. Acest anticorp este descris în Figuri ca 18G10-G2a. (Izotipul IgG1 de șoarece prezintă izotipul de șoarece, omolog izotipului uman IgG4).
- Anticorpul chimeric de șobolan anti-TIGIT de șoarece 18G10, care cuprinde o regiune Fc de șoarece de subtipul mIgG2a. Acest anticorp este descris în Figuri ca 18G10-G2a. (Izotipul IgG2a de șoarece prezintă izotipul de șoarece, omolog izotipului uman IgG1).
- Anticorpul de control al izotipului IgG1 de șoarece (anticorp monoclonal de control, corespunzător izotipului IgG1 de șoarece, specific pentru hexonul adenoviral 25).
- Anticorpul de control al izotipului IgG1 de șobolan (anticorp monoclonal de control, corespunzător izotipului IgG1 de șobolan, specific pentru IL-4 uman).
- Anticorpul de control al izotipului IgG2a de șoarece (anticorp monoclonal de control, corespunzător izotipului IgG2a de șoarece, specific pentru hexonul adenoviral 25).

##### Componentele reactivilor-anticorpi.

##### Componentele au fost următoarele:

- mIgG1: 75 mM NaCl, 10 mM fosfat de sodiu, 3% zaharoză, pH 7,4;
- anticorpul anti-PD-1: 20 mM acetat de sodiu, 9% zaharoză, pH 5,5; mIgG2a: 75 mM NaCl, 10 mM fosfat de sodiu, 3% zaharoză, pH 7,3;
- IgG1 de șobolan: 20 mM acetat de sodiu, 7% zaharoză, pH 5,5; 18G10: 20 mM NaAc, 100 mM NaCl, 3% zaharoză; 18G10-G1: 20 mM NaAc, 9% zaharoză, pH 5,5; 18G10-G2a: 20 mM NaAc, 9% zaharoză, pH 5,5.

##### Prepararea și implantarea liniei de celule tumorale:

Celulele carcinomului de colon CT26 au fost cultivate în mediul RPMI, suplimentat cu ser fetal bovin de 10%, inactivat prin încălzire.  $3 \times 10^5$  în faza de log și celule sub-confluente CT26 au fost injectate subcutanat (s/c) într-un volum de 100  $\mu$ L de RPMI libere de ser în partea dorsală inferioară din dreapta a șoldului fiecărui șoarece. Șoarecii au fost mai întâi rași cu o mașină electronică în zona care urma să fie folosită pentru implantare.

CT-26 prezintă o linie celulară de adenocarcinom colorectal de șoarece, singenică pentru linia BALB/c de șoarece. CT-26 este un sistem model relevant pentru evaluarea mecanismului de acțiune a anticorpului anti-PD-1, datorită profilului molecular translatabil al acestei tumori după tratament cu anti-PD-1.

5 Măsurătorile tumorii și greutatea corporale:

Tumorile au fost măsurate în ziua premergătoare administrării primei doze și de două ori pe săptămână după aceea. Lungimea și lățimea tumorii au fost măsurate utilizând șublere electronice și volumul tumoral a fost determinat folosind formula  $Volumul (mm^3) = 0,5 \times lungimea \times lățimea^2$ , în cazul în care dimensiunea lungimii este mai mare. Șoarecii au fost 10 cântăriți periodic pentru a monitoriza starea lor generală de sănătate, însă, de asemenea, și pentru a estima doza reală pentru furnizare în mg/kg per șoarece, în cazul în care este necesar. Înainte de tratament, șoarecii au fost cântăriți și au fost măsurate tumorile unor șoareci individuali. Pentru a preveni abaterile, orice valoare atipică în volumul sau greutatea tumorii șoarecilor au 15 fost eliminate, iar șoarecii rămași au fost randomizați în diferite grupuri de tratament cu o dimensiune medie echivalentă a tumorii.

Prepararea, administrarea și analiza soluțiilor pentru dozare:

Stocurile congelate de soluții primare ale anticorpilor, care urmau să fie testați pe modelul animal, au fost decongelate și transferate în gheață umedă. Pentru a evita o congelare și o 20 decongelare repetate, fiecare flacon cu soluție primară a fost decongelat o singură dată și porționate pe alicote în volume suficiente pentru o singură utilizare. În acest scop, au fost folosite eprubete de polipropilenă cu aderență redusă. Alicotele au fost congelate rapid în gheață uscată și stocate la  $-80^\circ C$ . Înainte de fiecare dozare, o alicotă a fost dezghețată, diluată cu un diluant adecvat până la concentrația nominală și administrată imediat. Alicotele soluțiilor pentru dozare au fost instantaneu congelate în gheață uscată și stocate la  $-80^\circ C$  până la efectuarea analizei. 25 Soluțiile pentru dozare au fost evaluate cu ajutorul platformei Meso Scale Discovery (MSD®, Rockville, MD), bazată pe tehnologia multiplex; o combinație de detecție prin electrochimiluminiscență și imunoteste multiplexate.

Rezultatele tratamentului cu dozarea anticorpilor anti-TIGIT/anti-PD1:

Șoarecii BALB/cAnN purtători de tumori CT26 au fost randomizați în 10 grupuri de 30 tratament în momentul când volumul mediu al tumorilor acestor șoareci a atins o dimensiune medie a tumorii de  $100 mm^3$  ( $80 mm^3 - 119 mm^3$ ) (1) controlul izotipului muIgG1 + controlul izotipului IgG1 de șobolan; (2) controlul izotipului muIgG1 + controlul izotipului muIgG2a; (3) muDX400 + controlul izotipului IgG1 de șobolan; (4) muDX400 + controlul izotipului muIgG2a; (5) controlul izotipului muIgG1 + 18G10; (6) control izotip muIgG1 + 18G10-G1; (7) 35 controlul izotipului muIgG1 + 18G10-G2a; (8) muDX400 + 18G10; (9) muDX400 + 18G10\_G1; (10) muDX400 + 18G10\_G2a. Animalelor li s-au administrat anticorpi de șobolan anti-TIGIT (18G10) de șoarece sau anticorpi anti-TIGIT 18G10-G1 sau anticorpi himerici anti-TIGIT 18G10-G2a (descriși mai sus) la o doză de 18 mg/kg, IP, la fiecare 4 zile pe parcursul fiecăruia din cele 6 cicluri. Anticorp anti-PD-1 de șoarece (descriș mai sus) a fost administrat la o doză de 40 10 mg/kg, IP, la fiecare 4 zile pe parcursul fiecăruia din cele 6 cicluri. După dozare, monitorizarea animalelor a continuat și volumele tumorilor au fost măsurate până la 76 de zile pentru unele grupuri de tratament. Tumorile au fost măsurate de două ori pe săptămână. Rezultatele sunt prezentate în Figurile 10 și 11. Pentru monoterapia cu anti-TIGIT utilizand 18G10-G2a, a fost relevată o inhibare de 44% creșterii tumorale (TGI) în ziua a 13-ea; în timp 45 ce pentru anticorpul parental 18G10 a fost relevată o inhibare de 38% și pentru anticorpul 18G10-G1 a fost relevată o inhibare de 36%. Pentru monoterapia cu anticorpul anti-PD1, combinat cu martorul izotipului rIgG1, s-au identificat 51% TGI în ziua a 13-ea. Când anticorpul anti-PD-1 a fost combinat cu controlul izotipului muIgG2a, s-au identificat 50% TGI și 10% regresie completă (CR) în ziua a 18-ea, astfel încât s-a observat 1 răspuns complet din 10 animale. Pentru combinația anticorpului anti-PD1 cu 18G10 parental au fost relevate 80% TGI în 50 ziua a 13-ea și au fost relevate 300% CR în ziua a 39-ea. Pentru combinația anticorpului anti-PD1 cu 18G10-G1 au fost relevate 59% TGI în ziua a 13-ea și au fost relevate 10% CR în ziua a 13-ea. Pentru combinația anticorpului anti-PD1 cu 18G10-G2a au fost relevate 88% TGI în ziua a 13-ea și au fost relevate 60% CR în ziua a 63-ea. Pentru combinația anticorpului anti-PD1 cu 55 18G10-G2a a fost relevată o activitate antitumorală mai mare și o regresie mai completă, în comparație cu combinațiile anticorpului anti-PD1 cu anticorpii 18G10 parental sau 18G10-G1. Nu a existat nici o pierdere semnificativă de greutate corporală, asociată cu administrarea monoterapiei sau a terapiei combinate, indicand faptul că tratamentele au fost bine tolerate.

## Exemplul 8

Efectul izotipului Fc asupra activității antitumorale a anticorpilor anti-TIGIT în modelul tumoral animal

5 Experimentul, descris în Exemplul 7, a fost repetat, cu excepția faptului că anticorpul 18G10 de șobolan a fost substituit cu anticorpul de șobolan 11A11.

Șoareci: Femelele de șoareci BALB/cAnN cu vârsta de aproximativ șapte sau opt săptămâni și greutatea corporală medie de 20 grame au fost obținute de la Taconic Laboratory (Germantown, NY). Hrana convențională pentru animale și apa au fost furnizate ad libitum.

## Reactivi-anticorpi:

- 10 · Anticorpul de șoarece anti-PD1 de șoarece - subtipul IgG1.  
 · Anticorpul de șobolan anti-TIGIT de șoarece (11A11) - subtipul IgG1 de șobolan. Acest anticorp este descris în Figuri ca 11A11 parental. Anticorpul 11A11 posedă secvența VH din SECV. ID NR. 138 și secvența VL din SECV. ID NR. 139.  
 · Anticorpul chimeric de șobolan anti-TIGIT de șoarece (11A11), care cuprinde o regiune  
 15 Fc de șoarece de subtipul mIgG1. Acest anticorp este descris în Figuri ca 11A11-G2a. (Izotipul IgG1 de șoarece prezintă constituie izotipul de șoarece, omolog izotipului uman IgG4) .  
 · Anticorpul chimeric de șobolan anti-TIGIT de șoarece 11A11, care cuprinde o regiune Fc de șoarece de subtipul mIgG2a. Acest anticorp este descris în Figuri ca 11A11-G2a. (Izotipul IgG2a de șoarece constituie izotipul de șoarece, omolog izotipului uman IgG1) .  
 20 · Anticorpul de control al izotipului IgG1 de șoarece (anticorp monoclonal de control, corespunzător izotipului IgG1 de șoarece, specific pentru hexonul adenoviral 25).  
 · Anticorpul de control al izotipului IgG1 de șobolan (anticorp monoclonal de control, corespunzător izotipului IgG1 de șobolan, specific pentru IL-4 uman).  
 · Anticorpul de control al izotipului IgG2a de șoarece (anticorp monoclonal de control,  
 25 corespunzător izotipului IgG2a de șoarece, specific pentru hexonul adenoviral 25).

## Componentele reactivilor-anticorpi.

## Componentele au constituit următoarele:

- mIgG1: 75 mM NaCl, 10 mM fosfat de sodiu, 3% zaharoză, pH 7,4;  
 · anticorpul anti-PD-1: 20 mM acetat de sodiu, 9% zaharoză, pH 5,5; mIgG2a: 75 mM  
 30 NaCl, 10 mM fosfat de sodiu, 3% zaharoză, pH 7,3;  
 · IgG1 de șobolan: 20 mM acetat de sodiu, 7% zaharoză, pH 5,5; 11A11: 20 mM NaAc, 100 mM NaCl, 3% zaharoză; 11A11-G1: 20 mM NaAc, 9% zaharoză, pH 5,5; 11A11-G2a: 20 mM NaAc, 9% zaharoză, pH 5,5.

## Prepararea și implantarea liniei de celule tumorale:

- 35 Celulele carcinomului de colon CT26 au fost cultivate în mediul RPMI, suplimentat cu ser fetal bovin de 10%, inactivat prin încălzire.  $3 \times 10^5$  în faza de log și celulele sub-confluente CT26 au fost injectate subcutanat (s/c) într-un volum de 100  $\mu$ L de RPMI liber de ser în partea dorsală inferioară din dreapta a șoldului fiecărui șoarece. Șoarecii au fost mai întâi rași cu o mașină electronică în zona care urma să fie folosită pentru implantare.

- 40 CT-26 prezintă o linie celulară de adenocarcinom colorectal de șoarece, singenică pentru linia de șoarece BALB/c. CT-26 constituie un sistem model relevant pentru evaluarea mecanismului de acțiune a anticorpului anti-PD-1, datorită profilului molecular translatabil după tratamentul cu anti-PD-1 al acestei tumori.

## Măsurătorile tumorii și greutății corporale:

- 45 Tumorile au fost măsurate în ziua premergătoare administrării primei doze și de două ori pe săptămână după aceea. Lungimea și lățimea tumorii au fost măsurate utilizând șublere electronice și volumul tumoral a fost determinat folosind formula  $Volumul (mm^3) = 0,5 \times lungimea \times lățimea^2$ , în cazul în care dimensiunea lungimii este mai mare. Șoarecii au fost cântăriți periodic pentru a monitoriza starea lor generală de sănătate, însă, de asemenea, și pentru  
 50 a estima doza reală pentru administrare în mg/kg per șoarece, în cazul în care este necesar. Înainte de tratament, șoarecii au fost cântăriți și au fost măsurate tumorile unor șoareci individuali. Pentru a preveni abaterile, orice valoare atipică în volumul sau greutatea tumorii au fost eliminate, iar șoarecii rămași au fost randomizați în diferite grupuri de tratament cu o dimensiune medie echivalentă a tumorii. Când volumul mediu al tumorii la șoarecii purtători de  
 55 tumoare CT26 a atins  $\sim 100 mm^3$ , peste aproximativ 7 zile de la implantare, animalele au fost randomizate în grupuri de tratament a câte 10 șoareci și a fost începută dozarea. Animalelor le-au fost administrate dozarea corespunzătoare concentrațiilor, specificate mai jos.

## Prepararea, administrarea și analiza soluției pentru dozare:

Stocurile congelate ale soluțiilor primare de anticorpi, care urmau să fie testați în modelul animal, au fost decongelate și transferate în gheață umedă. Pentru a evita o congelare și o decongelare repetate, fiecare flacon cu soluție primară a fost decongelat o singură dată și au fost porționate în alicote în volume suficiente pentru o singură utilizare. În acest scop, au fost folosite eprubete de polipropilenă cu aderență scăzută. Alicotele au fost congelate rapid în gheață uscată și stocate la -80°C. Înainte de fiecare dozare, o alicotă a fost decongelată, diluată cu un diluant adecvat până la concentrația nominală și administrată imediat. Alicotele soluțiilor pentru dozare au fost instantaneu congelate în gheață uscată și stocate la -80°C până la efectuarea analizei. Soluțiile de dozare au fost evaluate cu ajutorul platformei Meso Scale Discovery (MSD®, Rockville, MD), care se bazează pe tehnologia multiplex; o combinație de detecție prin electrochimiluminiscență și imunoteste multiplexate.

Rezultatele tratamentului cu dozarea anticorpilor anti-TIGIT/anti-PD1:

Șoarecii BALB/cAnN purtători ai tumorii CT26 au fost randomizați în 10 grupuri de tratament în momentul când volumul mediu al tumorilor acestor șoareci a atins o dimensiune medie a tumorii de 100 mm<sup>3</sup> (75 mm<sup>3</sup> - 115 mm<sup>3</sup>) (1) controlul izotipului muIgG1 + controlul izotipului IgG1 de șobolan; (2) controlul izotipului muIgG1 + controlul izotipului muIgG2a; (3) muDX400 + controlul izotipului IgG1 de șobolan; (4) muDX400 + controlul izotipului muIgG2a; (5) controlul izotipului muIgG1 + 11A11; (6) controlul izotipului muIgG1 + 11A11-G1; (7) controlul izotipului muIgG1 + 11A11-G2a; (8) muDX400 + 11A11; (9) muDX400 + 11A11\_G1; (10) muDX400 + 11A11\_G2a. Animalelor li s-au administrat anticorpi de șobolan anti-TIGIT de șoarece (11A11) sau anticorpi chimerici anti-TIGIT 11A11-G1, sau 11A11-G2a (descriși mai sus) la o doză de 20 mg/kg, IP, la fiecare 4 zile pe parcursul fiecăruia din cele 6 cicluri. Anticorpul anti-PD-1 de șoarece (descriș mai sus) a fost administrat la o doză de 10 mg/kg, IP, la fiecare 4 zile pe parcursul fiecăruia din cele 6 cicluri. După dozare, monitorizarea animalelor a continuat și volumele tumorilor au fost măsurate până la 54 de zile pentru unele grupuri de tratament. Tumorile au fost măsurate de două ori pe săptămână. Rezultatele sunt prezentate în Figurile 12 și 13. Pentru monoterapia cu anti-TIGIT, utilizând 11A11-G2a, s-a relevat inhibarea de 52% a creșterii tumorale (TGI) în ziua a 14-ea; în timp ce s-a observat de la o mică până la o lipsă de activitate la utilizarea anticorpului parental 11A11 sau anticorpului 11A11-G1. Pentru monoterapia cu anticorpul anti-PD1, s-au relevat 40-50% TGI în ziua a 14-ea. Atunci când anticorpul anti-PD-1 a fost combinat cu martorul izotipului de șobolan IgG1, s-au relevat 10% cazuri de regresie completă (CR) în ziua a 28-a, astfel încât s-a observat 1 răspuns complet la 10 animale. Pentru combinația anticorpului anti-PD1 cu 11A11 parental s-au relevat 60% TGI în ziua a 14-ea și s-au relevat 30% CR în ziua a 54-a. Pentru combinația anticorpului anti-PD1 și cu 11A11-G1 s-au relevat 56% TGI în ziua a 14-ea și s-au relevat 10% CR în ziua a 25-ea. Pentru combinația anticorpului anti-PD1 cu 11A11-G2a s-au relevat 94% TGI în ziua a 14-ea și s-au relevat 70% CR în ziua a 42-a. Pentru combinația anticorpului anti-PD1 cu 11A11-G2a s-au relevat o activitate antitumorală mai mare și o regresie mai completă, în comparație cu combinațiile anticorpului anti-PD1 cu 11A11 parental sau 11A11-G1. Nu a existat nici o pierdere semnificativă în greutatea corporală, asociată cu administrarea monoterapiei sau a terapiei combinate, indicând faptul că tratamentele au fost bine tolerate.

#### Exemplul 9

Cartografierea epitopică a anticorpului anti-hTIGIT 14A6 prin intermediul spectrometriei de masă cu schimb de hidrogen-deuteriu

Zonele de contact dintre anticorpii anti-TIGIT 14A6 și TIGIT uman au fost determinate utilizând analiza efectuată prin spectrometrie de masă (HDX-MS) cu schimb de hidrogen-deuteriu. HDX-MS măsoară schimbul de hidrogen cu deuteriu în coloana vertebrală amidă a proteinei. Nivelul de schimb este influențat de expunerea hidrogenului la solvent. Prin compararea nivelurilor de schimb din antigen, atunci când anticorpul este legat, se pot identifica regiunile proteinei în care se leagă anticorpul.

#### Materiale

· TIGIT-His uman, care cuprinde domeniul extracelular al hTIGIT (resturile 25-150 din SECV. ID NR. 31) și marcajul histidină (SECV. ID NR. 87).

· Anticorpul de șobolan anti-hTIGIT 14A6 (care cuprinde secvențele VH/VL din SECV. ID NR. 7/8 (lotul nr. 78AGU) și o regiune Fc a IgG2a de șobolan) (mAb de șobolan x [TIGIT\_H] (LB155.14A6.G2.A8) IgG2a/kappa (HY)).

Cromatografia lichidă (LC)-spectrometria de masă (MS)

Spectrometrul de masă a fosprezintă un Thermo Scientific Orbitrap-Velos. Pentru măsurarea probelor marcate cu deuteriu, spectrometrul de masă a fost config.t pentru a obține datele unei scanări MS într-un diapazon complet în trapa ionică orbitală la o rezoluție de 60000, un număr de ioni țintă de  $1E6$ , un timp maxim de injecție a ionului de 500 milisecunde și două microscanări. Pentru achiziționarea de date MS/MS pentru identificarea peptidelor, spectrometrul de masă a fost config.t pentru a obține un spectru complet de scanare la o rezoluție de 60000, urmat de 10 spectre MS/MS, în funcție de datele din trapa ionică.

Sistemul de cromatografie lichidă a prezentat un Waters® nanoACQUITY pentru gradientul coloanei analitice și o pompă izocratică Waters® 515 pentru pentru clivajul și aplicarea probei. Pentru clivajul și aplicarea probei, tamponul utilizat a constituit acetonitril de 2% și acid trifluoracetic de 0,05% la un debit de 80  $\mu$ l/min. Pentru gradientul analitic, tamponurile au prezentat tamponul A) acid formic de 0,1% în apă și tamponul B) acid formic de 0,1% în acetonitril.

Gradientul a fost trecut la 40  $\mu$ l/min de la 2% B până la 36% B în 10 minute, urmat de o spălare ulterioară la 80% B timp de 2 minute și o reechilibrare la 2% B timp de 3 minute. Coloana a fost mai apoi spălată prin trecerea periodică a gradientului de la 2% până la 80% B, de trei ori a câte 1 min la fiecare etapă, urmat de o echilibrare finală la 2% B timp de 5 minute. Coloana de captare a prezentat o capcană de protecție Waters® Vanguard C18 BEH 1.7  $\mu$ m, și coloana analitică a prezentat o coloană Waters® C18 BEH300 1.7  $\mu$ m 1x50 mm.

Manipularea mostrei pentru marcarea cu deuteriului a fost realizată printr-un sistem Leaptec H/D-X PAL. Pe placa pentru etichetarea probelor a fost stabilită temperatura de 25°C, pe placa pentru stingerea (stoparea) reacției a fost stabilită temperatura de 1,5°C, și în camera pentru trapa ionică și coloana analitică a fost stabilită temperatura de 1,5°C. Coloana cu pepsină imobilizată (Porosyme Immobilized Pepsin 2, 1x30 mm, Life Technologies) a fost menținută în afara camerei pentru coloane, la temperatura ambiantă.

#### Marcarea deuteriului

hTIGIT-His (30 pmol/ $\mu$ l) a fost amestecat cu un volum egal de anticorp (14 pmol/ $\mu$ l) sau, pentru martorul nelegat, cu PBS pH 7,6. Probele legate la anticorp și martorul nelegat au fost incubate la temperatura camerei timp de 1 oră înainte de începerea experimentului de marcarea.

Pentru marcarea probelor cu deuteriu, 2  $\mu$ l de probă au fost amestecate cu 25  $\mu$ l de PBS în oxid de deuteriu pD 7,6. Timpii de marcarea au fost de 30, 300, 1500, 4500 sau 9000 secunde. După expirarea timpului fixat, 25  $\mu$ l de amestec marcat s-au adăugat la 35  $\mu$ l de tampon rece de stopare (8 M uree, 100 mM TCEP). Proba stinsă a fost incubată la temperatura de 1,5°C, timp de 1 minut. După aceasta, 55  $\mu$ l au fost injectate în camera de răcire a coloanei, în care proba a fost trecută prin coloana pepsinei și peptidele rezultate au fost încărcate în coloana de captare. După trei minute, un întrerupător de supapă a deconectat coloana pepsinei din linie, iar capcana a fost spălată timp de încă un minut. După aceea, capcana a fost comutată în linie cu coloana analitică și gradientul analitic, și spectrometrul de masă a demarat.

O probă complet deuterată a fost generată prin incubarea a 2  $\mu$ l de hTIGIT cu 108  $\mu$ l de tampon denaturant deuterat (4 M uree, 100 mM TCEP, 0,01% DDM în oxid de deuteriu de 99,5%). Proba a fost incubată la temperatura camerei peste noapte. După aceasta, 55  $\mu$ l a fost injectată direct în camera pentru coloane și datele au fost obținute ca mai sus.

#### Analiza datelor

Datele LC-MS/MS au fost obținute dintr-o probă nemarcată și au fost cercetate înainte de marcarea cu deuteriu, pentru a verifica dezintegrarea reușită a proteinelor și pentru a genera lista de peptide de după dezintegrarea pepsinei. Datele au fost căutate cu ajutorul Proteome Discoverer 1.4 și al algoritmului de căutare SEQUEST HT (ThermoFisher Scientific). Baza de date de proteine utilizată reprezintă secvențele anticorpilor TIGIT-His uman și anti-hTIGIT a fost legată cu baza de date de drojdii *Saccharomyces cerevisiae* uniprot (5/20/13).

Datele MS din experimentul de marcarea a deuteriului au fost procesate cu ajutorul HDExaminer (versiunea 1.3, Sierra Analytics). Masa și timpul de retenție, selectate de către software pentru fiecare peptidă, au fost verificate în mod manual.

#### Rezultate

Peptidele TIGIT umane, protejate prin legarea anticorpului 14A6, sunt ilustrate în Heatmap din Fig. 14 și corespund resturilor de aminoacizi 54-57, 68-70 și 76-81 din SECV. ID NR. 31. (Aceiași aminoacizi sunt prezentați ca resturile 30-33, 44-46 și 52-57 din SECV. ID NR. 87).

## Exemplul 10

Cartografierea epitopică a anticorpului hTIGIT 31C6 prin spectrometrie de masă cu schimb hidrogen-deuteriu

Zonele de contact dintre anticorpii anti-TIGIT 31C6 și TIGIT uman au fost determinate prin utilizarea analizei efectuate cu spectrometrie de masă cu schimb hidrogen-deuteriu (HDX-MS). HDX-MS măsoară înlocuirea hidrogenului cu deuteriu în coloana vertebrală amidă a proteinei. Unul dintre factorii care influențează nivelul de schimb îl constituie expunerea hidrogenului la solvent. Prin compararea nivelurilor de schimb din antigen, atunci când anticorpul este legat, se pot identifica regiunile proteinei în care se leagă anticorpul.

## Materiale

- TIGIT-His uman care cuprinde domeniul extracelular al hTIGIT (resturile 25-145 din SECV. ID NR. 31) și marcajul histidinic (SECV. ID NR. 87).

- Anticorpul de șoarece anti-hTIGIT 31C6 (lotul nr. 41 AHK) (mAb de șoarece x [TIGIT\_H] (MEB125.31C6.A1.205) IgG1/kappa (HY)).

## Cromatografia lichidă-spectrometria de masă

Spectrometrul de masă a prezentat un Thermo Scientific Orbitrap-Elite. Pentru măsurarea probelor marcate cu deuteriu, spectrometrul de masă a fost configurat pentru a obține datele unei scanări complete MS în trapa ionică orbitală la o rezoluție de 120000, un număr de ioni țintă de  $1 \times 10^6$ , un timp maxim de injecție a ionului de 500 milisecunde și două microscanări. Pentru obținerea datelor MS/MS pentru identificarea peptidelor, spectrometrul de masă a fost configurat pentru a se obține un spectru complet de scanare la o rezoluție de 120000, cu următoarele 10 spectre MS/MS, în funcție de datele din capcana ionică.

Sistemul de cromatografie lichidă a prezentat un Waters nanoAcquity pentru gradientul coloanei analitice și o pompă izocratică Waters 515 pentru dezintegrarea și aplicarea probelor. Pentru dezintegrarea și aplicarea probelor, tamponul utilizat a prezentat 2% acetonitril și 0,05% acid trifluoracetic la un debit de 80  $\mu$ l/min. Pentru gradientul analitic, tamponul A a prezentat 0,1% acid formic în apă și tamponul B) 0,1% acid formic în acetonitril.

Gradientul a fost trecut la 40  $\mu$ l/min de la 2% B până la 36% B în 10 minute, urmat de o spălare la 80% B timp de 2 minute și o reechilibrare la 2% B timp de 3 minute. Coloana a fost mai apoi spălată prin trecerea periodică a gradientului la 2% și 80% B, de trei ori a câte 1 min la fiecare etapă, urmat de o echilibrare finală la 2% B timp de 5 minute. Coloana de captare a prezentat o coloană de protecție Waters Vanguard CSH C18 1,7  $\mu$ m și coloana analitică a prezentat o coloană Waters CSH C18 1,7  $\mu$ m 1x50 mm.

Prelucrarea mostrelor pentru marcarea cu deuteriu a fost realizată printr-un sistem Lealtel H/D-X PAL. Placa cu probe pentru marcarea a fost configurată la temperatura de 25°C, în placa pentru stoparea reacției a fost stabilită o temperatură de 1,5°C, iar în camera pentru capcană și coloana analitică a fost stabilită o temperatură de 1,5°C. Coloana cu pepsină imobilizată (Enzymate BEH Pepsin, Waters Corporation) a fost menținută în afara camerei pentru coloane la temperatura ambiantă.

## Marcarea cu deuteriu

hTIGIT-His (63 pmol/ $\mu$ l) a fost amestecat cu un volum egal de anticorp (32 pmol/ $\mu$ l) sau, pentru matorul nelegat, cu PBS pH 7,6. Probele legate la anticorp și matorul nelegat au fost incubate la temperatura camerei timp de 1 oră înainte de începerea experimentului de marcarea.

Pentru marcarea probelor cu deuteriu, 2  $\mu$ l de probă au fost amestecate cu 25  $\mu$ l de PBS în oxid de deuteriu cu pH 7,6. Punctele temporale de marcarea au fost de 30, 300, 1500, 4500 sau 9000 secunde. După expirarea timpului stabilit, 25  $\mu$ l de amestec destinat marcării au fost adăugate la 35  $\mu$ l de tampon rece pentru stoparea reacției (8 M uree, 100 mM TCEP). După stoparea reacției, proba a fost incubată la temperatura de 1,5°C, timp de 1 minut. În continuare, 55  $\mu$ l au fost injectate în coloana din camera de răcire, în care proba a fost trecută prin coloana cu pepsină, iar peptidele obținute au fost aplicate pe coloana de captare. După trei minute, printr-un comutator de supapă coloana cu pepsină a fost deconectată de la linie și capcana a fost spălată timp de încă 1 minut. După aceasta, capcana a fost unită la linia cu coloană analitică și au fost conectați gradientul analitic și spectrometrul de masă. Fiecare punct temporal a fost obținut în trei exemplare în ordine aleatorie.

Proba complet deuterată a fost obținută prin incubarea a 2  $\mu$ l de hTIGIT (63 pmol/ $\mu$ l cu 108  $\mu$ l de tampon denaturant deuterat (4 M uree, 100 mM TCEP, 0,01% DDM în 99,5% oxid de deuteriu). Proba a fost incubată la temperatura camerei timp de o noapte. În continuare, 55  $\mu$ l au fost injectate direct în camera pentru coloane și datele au fost obținute ca mai înainte.

## Analiza datelor

Datele LC-MS/MS au fost obținute pentru o probă nemarcată și au fost examinate în baza de date pentru a verifica dezintegrarea reușită a proteinelor și pentru a obține lista de peptide de după dezintegrarea cu pepsină. Căutarea datelor în baza de date a fost efectuată folosind

5 Proteome Discoverer 1.4 și algoritmul de căutare SEQUEST HT (ThermoFisher Scientific). Baza de date a proteinelor, utilizată pentru secvențele anticorpilor TIGIT-His uman și anti-hTIGIT, a fost legată la baza de date pentru drojdia *Saccharomyces cerevisiae* uniprot (5/20/13).

10 Datele MS pentru experimentele de marcarea cu deuteriu au fost procesate cu ajutorul HDExaminer (versiunea 1.3, Sierra Analytics). Masa și timpul de retenție, selectate cu ajutorul software pentru fiecare peptidă, au fost verificate în mod manual.

## Rezultate

15 Peptidele TIGIT umane, protejate prin intermediul legării anticorpului 31C6, sunt ilustrate în Heatmap din Fig. 15 și corespund resturilor de aminoacizi 53-57, 60-65, 68-70, 72-81, 94-95, 109-119 din SECV. ID NR. 31. (Aceiași aminoacizi sunt reprezentați ca resturile 29-33, 36-41, 44-46, 48-57, 70-71, 85-95 din SECV. ID NR. 87).

## Exemplul 11

Testul de activitate a celulelor T *in vitro* pentru anticorpii umanizați anti-hTIGIT

20 În continuare, autorii invenției de față au analizat activitatea diferitelor variante umanizate ale unuia dintre anticorpii conform invenției (31C6). Într-un test, autorii prezentei invenții au caracterizat consecințele funcționale ale blocării receptorului TIGIT uman folosind celulele hTIGIT-Jurkat. În analiza dată, hTIGIT-Jurkat au fost cultivate împreună cu celulele JY, concepute pentru expresia CD155 uman (hCD155-JY). Linia celulară JY utilizată reprezintă linia de celule B limfoblastoidă, imortalizată prin intermediul virusului Epstein-Barr (EBV). La

25 fel ca și în testul descris mai sus în Exemplul 3, atunci când celulele hTIGIT-Jurkat sunt stimulate cu ajutorul  $\alpha$ -CD3, legat la placă, și sunt cultivate împreună cu celulele JY parentale (care nu exprimă CD155 uman), ele produc IL-2. Totodată, în cazul în care hTIGIT-Jurkat au fost cultivate împreună cu hCD155-JY, nivelurile de IL-2 se reduceau într-un mod dependent de ligand. Tratamentul cu anticorpii anti-hTIGIT restabilește producția de IL-2 în acest test într-o

30 manieră dependentă de doză.

În testul dat, plăcile cu fund plat de 96 de godeuri au fost acoperite cu anticorpul de șoarece anti-CD3 uman (1  $\mu$ g/ml în PBS; Clona HIT3a, BD Pharmingen Cat. nr. 555336) pe parcursul unei nopți la temperatura de 4°C. A doua zi, celulele Jurkat (50000) exprimând hTIGIT au fost însemănțate pe plăci pre-acoperite și se efectua incubarea prealabilă timp de 30-

35 60 minute cu mAb de diverse concentrații. Celulele JY (50000) exprimand CD155 uman au fost adăugate la cultură. După incubarea timp de 18-24 de ore la temperatura de 37°C și CO<sub>2</sub> de 5,0%, nivelurile de IL-2 în supernatantii de cultură au fost evaluați prin intermediul mezoscării (kitul Human IL-2 Tissue Culture MESO: Cat. nr. K151AHB-2). Rezultatele sunt prezentate în Fig. 16. Atunci când a fost efectuată titrarea anticorpului parental de șoarece anti-hTIGIT al clonei 31C6 (MEB125.31C6.A1.205 mlgG1) de la 30  $\mu$ g/ml până la 0,04  $\mu$ g/ml, a fost obținut EC<sub>50</sub> de 0,730  $\mu$ g/ml și atunci când a fost efectuată aceeași titrare a 31C6 chimeric uman-șoarece (MEB125.31C6.A1.205 IgG1 himeric uman-șoarece), a fost obținut EC<sub>50</sub> de 0,910  $\mu$ g/ml. (31C6 chimeric uman-șoarece cuprindea regiunile variabile ale clonei parentale 31C6 (SECV. ID NR: 94 și 95) și regiunea IgG1 umană). În mod similar, la efectuarea titrării variantelor umanizate ale

45 31C6 de la 30  $\mu$ g/ml până la 0,04  $\mu$ g/ml au fost obținute următoarele EC<sub>50</sub>:

| Varianta umanizată                                                                                                                 | EC <sub>50</sub> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| MEB125.31C6.A1.205 VH4/VL1<br>(Anticorp cuprinzând VH din SECV. ID NR. 127 și VL din SECV. ID NR. 130, și regiunea Fc a IgG1 uman) | 0,620 $\mu$ g/ml |
| MEB125.31C6.A1.205 VH5/VL4<br>(Anticorp cuprinzând VH din SECV. ID NR. 128 și VL din SECV. ID NR. 133, și regiunea Fc a IgG1 uman) | 1,2 $\mu$ g/ml   |
| MEB125.31C6.A1.205 VH5/VL3<br>(Anticorp cuprinzând VH din SECV. ID NR. 128 și VL din SECV. ID NR. 132, și regiunea Fc a IgG1 uman) | 1,2 $\mu$ g/ml   |

Autorii invenției de față au folosit, de asemenea, un test pe bază de celule primare pentru a demonstra că anticorpii anti-hTIGIT umanizați posedă activitate în raport cu celulele primare.

Mai multe loturi de celule mononucleare din sangele periferic uman (PBMC) au fost analizate cu privire la expresia TIGIT după stimulare (stimularea reacției limfocitare mixte și stimularea  $\alpha$ -CD3). În continuare, celulele PBMC au fost selectate pentru testele pe bază de celule primare în funcție de expresia lor de TIGIT după stimulare. Plăcile de cultură tisulară au fost acoperite cu

- 5 HuCD155-Fc, iar celulele PBMC au fost stimulate cu anti-CD3.
- În acest test, plăcile de legare înaltă cu 96 de godeuri (Corning 3361) au fost acoperite cu CD155-Fc uman (de producție proprie, 1  $\mu$ g/ml în PBS) pe parcursul unei nopți la temperatura de 4°C. În ziua următoare, 50000 PBMC uman (Precision Bioservice cat. nr. 83000C-1,0, lotul nr. 12920 în RPMI + 10% ser uman Bio-world cat. nr. 30611043-1, lotul nr. V15022401, RBC
- 10 au fost îndepărtate prin intermediul BD Pharmlyse BD cat. Nr. 555899), au fost însămânțate pe plăci pre-acoperite și a fost efectuată incubarea preliminară timp de 30-60 minute cu mAb anti-TIGIT de diverse concentrații. În continuare, s-a adăugat anticorpul anti-CD3 (eBioscience 16-0037-85) în concentrație finală de 1  $\mu$ g/ml. După incubarea timp de 48 de ore la temperatura de 37°C și CO<sub>2</sub> de 5,0%, citokinele pro-inflamatorii (IFN $\gamma$ , IL1 $\beta$ , IL6 și TNF $\alpha$ ) au fost evaluate în
- 15 supernatanții de cultură prin intermediul testului cu mezoscară (kitul Human Proinflammatory-4 I tissue culture MESO: cat. Nr. K15009B-4). După cum se arată în Fig. 17, variantele umanizate ale 31C6 au fost capabile să stimuleze IL-6, TNF $\alpha$  și IFN $\gamma$  într-un mod dependent de doză, similar cu anticorpul himeric 31C6 uman-șoarece.

Înscrisurile din Fig. 17 corespund următorilor anticorpi:

- 20 · MEB125.31C6.A1.205 IgG1 chimeric uman-șoarece corespunde anticorpului cuprinzând regiunile variabile ale clonei parentale 31C6 (SECV. ID NR. 94 și 95) și regiunea Fc a IgG1 uman)
- MEB125.31C6.A1.205 VH4/VL1 corespunde anticorpului cuprinzând VH din SECV. ID NR. 127 și VL din SECV. ID NR. 130, și regiunea Fc a IgG1 uman).
- 25 · MEB125.31C6.A1.205 VH5/VL4 corespunde anticorpului cuprinzând VH din SECV. ID NR. 128 și VL din SECV. ID NR. 133, și regiunea Fc a IgG1 uman).
- MEB125.31C6.A1.205 VH5/VL3 corespunde anticorpului cuprinzând VH din SECV. ID NR. 128 și VL din SECV. ID NR. 133, și regiunea Fc a IgG1 uman).

- Conținutul tuturor referințelor citate în documentul de față este încorporat în calitate de referință în aceeași măsură, ca și în cazul în care ar fost indicat în mod concret și individual că conținutul fiecărei publicații în parte, înscrieri din bazele de date (de exemplu, secvențele din GenBank sau înscrierile din GenID), cereri de brevet sau brevet este încorporată în documentul de față în calitate de referință. Această afirmație de încorporare în calitate de referință este destinată solicitanților, în conformitate cu 37 C.F.R. 1.57(b)(1), pentru a se referi la fiecare, fără
- 35 excepție, publicație individuală, înscriere în bazele de date (de exemplu, secvențele în GenBank sau înscrierile în GenID), cererile de brevet sau brevetele, fiecare dintre acestea fiind identificate în mod clar în conformitate cu 37 C.F.R. 1.57(b)(2), chiar și în cazul în care o astfel de citare nu este imediat adiacentă unei afirmații dedicate de încorporare în calitate de referință. Includerea afirmațiilor dedicate de încorporare în calitate de referință, dacă acestea sunt prezente
- 40 în descriere, nu slăbește în nici un mod această afirmație generală de încorporare în calitate de referință. Citarea referințelor prezentate în documentul de față nu vizează recunoașterea faptului că referința se referă la stadiul anterior al tehnicii și nici nu constituie vreo recunoaștere cu privire la conținutul sau data acestor publicații sau documente.

- Volumul prezentei invenții nu este destinat să limiteze prin variantele concrete de realizare, descrise în documentul de față. Într-adevăr, diferite modificări ale invenției, în completarea celor descrise în prezentul document, vor deveni evidente specialiștilor din domeniul de referință din descrierea prezentată mai sus și din figurile însoțitoare. Astfel de modificări sunt destinate să fie încadrate în volumul revendicărilor anexate.

- Descrierea prezentată mai sus este considerată a fi suficientă pentru a permite unui specialist din domeniul de referință să pună în practică invenția. Diversele modificări ale invenției, în completarea celor prezentate și descrise în documentul de față, vor deveni evidente specialiștilor în domeniu dat din descrierea expusă mai sus și sunt incluse în volumul revendicărilor anexate ale invenției.

Informația cu privire la secvențe

- 55 Tabelul 4

| Descriere     | SECV ID NR. | SECVENȚA         |
|---------------|-------------|------------------|
| 14A6 H - CDR1 | 1           | SDYWG            |
| 14A6 H - CDR2 | 2           | FITYSGSTSYNPSLKS |

# MD 4733 C1 2021.07.31

88

|                      |    |                                                                                                                                            |
|----------------------|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 14A6 H - CDR3        | 3  | MPSFITLASLSTWEGYFDF                                                                                                                        |
| 14A6 L - CDR1        | 4  | KASQSIHKNLA                                                                                                                                |
| 14A6 L - CDR2        | 5  | YANSLQT                                                                                                                                    |
| 14A6 L - CDR3        | 6  | QQYYSGWT                                                                                                                                   |
| 14A6<br>VH PARENTALĂ | 7  | EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGSSIASDYWG WIRKFPGNKMEWMG<br>FITYSGSTSYNPSLKSRISITRDTSKNQFFLQLHSVTDDTATYSCARMPSF<br>ITLASLSTWEGYFDFWGPQTMVTVSS    |
| 14A6<br>VL PARENTALĂ | 8  | DIQMTQSPSLLSASVGDRTVLNCKASQSIHKNLA WYQQKLGEAPKFLIY<br>YANSLQTGIPSRFSGSGSGTDFTLTISGLQPEDVATYFCQQYYSGWTFGG<br>GTKVELK                        |
| Hu14A6VH.1           | 9  | EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSDYWG WIRQPPGKGLEWIGFI<br>TYSGSTSYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARMPSF<br>ITLASLSTWEGYFDFWGPQTMVTVSS   |
| Hu14A6VH.1a          | 10 | EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSDYWG WIRQPPGKGLEWIGFI<br>TYSGSTSYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARMPSFI<br>TLASLSTWEGYFDFWGPQTMVTVSS   |
| Hu14A6VH.1b          | 11 | EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSDYWG WIRQPPGKGLEWIGFI<br>TYSGSTSYNPSLKSRITISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARMPSFI<br>TLASLSTWEGYFDFWGPQTMVTVSS   |
| Hu14A6VH.1c          | 12 | EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSDYWG WIRQPPGKGLEWMG<br>FITYSGSTSYNPSLKSRITISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARMPS<br>FITLASLSTWEGYFDFWGPQTMVTVSS   |
| Hu14A6VH.1d          | 13 | EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSDYWG WIRQPPGKGLEWIGFI<br>TYSGSTSYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLHSTVTAADTAVYYCARMPSF<br>ITLASLSTWEGYFDFWGPQTMVTVSS  |
| Hu14A6VH.1e          | 14 | EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSDYWG WIRQPPGKGLEWIGFI<br>TYSGSTSYNPSLKSRITISRDTSKNQFSLKLHSTVTAADTAVYYCARMPSFI<br>TLASLSTWEGYFDFWGPQTMVTVSS  |
| Hu14A6VH.1f          | 15 | EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSDYWG WIRQPPGKGLEWIGFI<br>TYSGSTSYNPSLKSRITISRDTSKNQFSLKLHSTVTAADTAVYYCARMPSFI<br>TLASLSTWEGYFDFWGPQTMVTVSS  |
| Hu14A6VH.1g          | 16 | EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSDYWG WIRQPPGKGLEWMG<br>FITYSGSTSYNPSLKSRITISVDTSKNQFSLKLHSTVTAADTAVYYCARMPS<br>FITLASLSTWEGYFDFWGPQTMVTVSS  |
| Hu14A6VH.2           | 17 | EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYSISSDYWG WIRQPPGKGLEWIGFI<br>ITYSGSTSYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARMPS<br>FITLASLSTWEGYFDFWGPQTMVTVSS  |
| Hu14A6VH.2a          | 18 | EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYSISSDYWG WIRQPPGKGLEWIGFI<br>ITYSGSTSYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARMPSF<br>ITLASLSTWEGYFDFWGPQTMVTVSS  |
| Hu14A6VH.2b          | 19 | EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYSISSDYWG WIRQPPGKGLEWIGFI<br>ITYSGSTSYNPSLKSRITISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARMPSFI<br>TLASLSTWEGYFDFWGPQTMVTVSS  |
| Hu14A6VH.2c          | 20 | EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGGSISSDYWG WIRQPPGKGLEWMG<br>FITYSGSTSYNPSLKSRITISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARMPS<br>FITLASLSTWEGYFDFWGPQTMVTVSS   |
| Hu14A6VH.2d          | 21 | EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYSISSDYWG WIRQPPGKGLEWIGFI<br>ITYSGSTSYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLHSTVTAADTAVYYCARMPS<br>FITLASLSTWEGYFDFWGPQTMVTVSS |
| Hu14A6VH.2e          | 22 | EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYSISSDYWG WIRQPPGKGLEWIGFI<br>ITYSGSTSYNPSLKSRITISRDTSKNQFSLKLHSTVTAADTAVYYCARMPSF<br>ITLASLSTWEGYFDFWGPQTMVTVSS |
| Hu14A6VH.2f          | 23 | EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGGSISSDYWG WIRQPPGKGLEWIGFI<br>TYSGSTSYNPSLKSRITISRDTSKNQFSLKLHSTVTAADTAVYYCARMPSFI<br>TLASLSTWEGYFDFWGPQTMVTVSS  |
| Hu14A6VH.2e          | 24 | EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGGSISSDYWG WIRQPPGKGLEWMG<br>FITYSGSTSYNPSLKSRITISRDTSKNQFSLKLHSTVTAADTAVYYCARMPS<br>FITLASLSTWEGYFDFWGPQTMVTVSS  |

|                                                      |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|------------------------------------------------------|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Hu14A6Vk.1                                           | 25 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSIHKNLAWYQQKPGKAPKLLIYY<br>ANSLQTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYSGWTFGGG<br>TKVEIK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Hu14A6Vk.1a                                          | 26 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSIHKNLAWYQQKPGKAPKFLIYY<br>ANSLQTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYSGWTFGGG<br>TKVEIK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Hu14A6Vk.1b                                          | 27 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSIHKNLAWYQQKPGKAPKFLIYY<br>ANSLQTGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYSGWTFGGG<br>TKVEIK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Hu14A6Vk.2                                           | 28 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSIHKNLAWYQQKPGKVPKLLIYY<br>ANSLQTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQQYYSGWTFGG<br>GTKVEIK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Hu14A6Vk.2a                                          | 29 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSIHKNLAWYQQKPGKVPKFLIYY<br>ANSLQTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQQYYSGWTFGG<br>GTKVEIK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Hu14A6Vk.2b                                          | 30 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSIHKNLAWYQQKPGKVPKFLIYY<br>ANSLQTGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQQYYSGWTFGGG<br>TKVEIK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| TIGIT uman                                           | 31 | mrwclliwa qglrqaplas gmmgtgiett gnisaekggs iilqchlsst taqvtqynwe qdqqla <b>icn</b><br>adlgw <b>hisps</b> fkdrrvapgp lgltlqslv ndtgeyfcy htydpdgyt rifleless vaehgarfqi<br>pllgamaatl vvictavivv valtrkkkal rihsvgedlr rksagqeews psapsppgsc vqaeaapagl<br>cgeqrgeedca elhdyfnvls yrslgncsf tetg                                                                                                                                                                                                    |
| TIGIT cinomolgus/<br>rhesus                          | 32 | mrwclliwa qglrqaplas gmmgtgiett gnisaekggs vilqchlsst maqvtqynwe qhdhslair<br>naelgwhiyp afkdrrvapgp glgltlqslv mndtgeyfcy yhtydpdgyt griflevles svaehsarfq<br>ipllgamamm lvviciaviv vvlarkkks lrihsvesgl qrkstgqeeq ipsapsppgs cvqaeaapag<br>legeqqgddc aelhdyfnvl syrlgscsf fletg                                                                                                                                                                                                                |
| Lanțul greu de<br>pembrolizumab                      | 33 | QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLE<br>WMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVY<br>YCARRDYRFDMGFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA<br>ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTP<br>SSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFL<br>FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK<br>PREEQFNSTYRVVSVLTVTLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA<br>KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE<br>NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY<br>TQKSLSLSLGK |
| Lanțul ușor de<br>pembrolizumab                      | 34 | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRL<br>LIYLAstylegvpARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQHSRDPLT<br>FGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ<br>WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE<br>VTHQGLSSPVTKSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Lanțul greu de<br>nivolumab                          | 35 | QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEW<br>VAVIWDGSKRYYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYY<br>CATNDDYWGQGTLLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD<br>YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTKTY<br>TCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL<br>MISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST<br>YRVVSVLTVTLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAAGQPREPQV<br>YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV<br>LDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG<br>K      |
| Lanțul ușor de<br>nivolumab                          | 36 | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLIYD<br>ASNRTGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQ<br>GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK<br>VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH<br>QGLSSPVTKSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 16AHA_tigit_14a6<br>umanizată_VH1<br>LB155.14A6.G2.A | 37 | EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGSSIASDYWGWRQPPGKGLEWIGFI<br>TYSGSTSYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARMPSF<br>ITLASLSTWEGYFDFWQGQTMVTVSSAS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |

|                                                                  |    |                                                                                                                                           |
|------------------------------------------------------------------|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 8_VH1                                                            |    |                                                                                                                                           |
| 18AHA_tigit_14a6<br>_umanizatã_VH2<br>LB155.14A6.G2.A<br>8_VH2   | 38 | EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGSSIASDYWGWRQPPGKGLEWIGFI<br>TYSGSTSYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARMPSFI<br>TLASLSTWEGYFDFWQGQTMVTVSS    |
| 20AHA_tigit_14a6<br>_umanizatã_VH3<br>LB155.14A6.G2.A<br>8_VH3   | 39 | EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGSSIASDYWGWRQPPGKGLEWIGFI<br>TYSGSTSYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARMPSFI<br>TLASLSTWEGYFDFWQGQTMVTVSS    |
| 21AHA_tigit_14a6<br>_umanizatã_VH4<br>LB155.14A6.G2.A<br>8_VH4   | 40 | EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGSSIASDYWGWRQPPGKKLEWIGFI<br>TYSGSTSYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARMPSFI<br>TLASLSTWEGYFDFWQGQTMVTVSS    |
| 19AHA_tigit_14a6<br>_umanizatã_VH5<br>LB155.14A6.G2.A<br>8_VH5   | 41 | EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGSSIASDYWGWRQPPGKMEWIGFI<br>ITYSGSTSYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARMPSFI<br>ITLASLSTWEGYFDFWQGQTMVTVSS   |
| 22AHA_tigit_14a6<br>_umanizatã_VH6<br>LB155.14A6.G2.A<br>8_VH6   | 42 | EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGSSIASDYWGWRQPPGKMEWIGFI<br>ITYSGSTSYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARMPSFI<br>ITLASLSTWEGYFDFWQGQTMVTVSS   |
| 23AHA_tigit_14a6<br>_umanizatã_VH7<br>LB155.14A6.G2.A<br>8_VH7   | 43 | EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGSSIASDYWGWRQPPGKGLEWIGFI<br>TYSGSTSYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARMPSFI<br>TLASLSTWEGYFDFWQGQTMVTVSS    |
| 24AHA_tigit_14a6<br>_umanizatã_VH8<br>LB155.14A6.G2.A<br>8_VH8   | 44 | EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGSSIASDYWGWRQPPGKMEWIGFI<br>ITYSGSTSYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARMPS<br>FITLASLSTWEGYFDFWQGQTMVTVSS    |
| 25AHA_tigit_14a6<br>_umanizatã_VH9<br>LB155.14A6.G2.A<br>8_VH9   | 45 | EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTSVTGSSIASDYWGWRQPPGKGLEWIGFI<br>TYSGSTSYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARMPSFI<br>TLASLSTWEGYFDFWQGQTMVTVSS   |
| 26AHA_tigit_14a6<br>_umanizatã_VH10<br>LB155.14A6.G2.A<br>8_VH10 | 46 | EVQLQQSGAGLLKPSETLSLTCTSVTGSSIASDYWGWRQPPGKGLEWIGFI<br>ITYSGSTSYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARMPS<br>FITLASLSTWEGYFDFWQGQTMVTVSS  |
| 27AHA_tigit_14a6<br>_umanizatã_VH11<br>LB155.14A6.G2.A<br>8_VH11 | 47 | EVQLQESGPGLVKPPGTLSLTCTSVTGSSIASDYWGWRQPPGKGLEWIGFI<br>ITYSGSTSYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARMPS<br>SFITLASLSTWEGYFDFWQGQTMVTVSS |
| 09AHA_tigit_14a6<br>_umanizatã_VL1<br>LB155.14A6.G2.A<br>8_VL1   | 48 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQSIHKNLAWYQQKPGKAPKLLIYY<br>ANSLQTGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYSGWTFGGG<br>TKVEIK                       |
| 11AHA_tigit_14a6<br>_umanizatã_VL2<br>LB155.14A6.G2.A<br>8_VL2   | 49 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQSIHKNLAWYQQKPGKAPKFLIYY<br>ANSLQTGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYSGWTFGGG<br>TKVEIK                       |
| 12AHA_tigit_14a6<br>_umanizatã_VL3<br>LB155.14A6.G2.A<br>8_VL3   | 50 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQSIHKNLAWYQQKPGKAPKLLIYY<br>ANSLQTGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQYYSGWTFGGG<br>TKVEIK                       |
| 13AHA_tigit_14a6<br>_umanizatã_VL4<br>LB155.14A6.G2.A<br>8_VL4   | 51 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQSIHKNLAWYQQKPGKAPKFLIYY<br>ANSLQTGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQYYSGWTFGGG<br>TKVEIK                       |
| 15AHA_tigit_14a6                                                 | 52 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQSIHKNLAWYQQKPGKAPKLLIYY                                                                                       |

|                                                  |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|--------------------------------------------------|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| _umanizată_VL5<br>LB155.14A6.G2.A<br>8_VL5       |    | <u>ANS</u> LQTGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC <u>QQYYSGWT</u> FGGG<br>TKVEIK                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Secvență lider de lanțuri grele                  | 53 | MEWSWVFLFFLSVTTGVHS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Secvență lider de lanțuri ușoare                 | 54 | MSVPTQVLGLLLLWLT DARC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| Domeniul constant al lanțului greu – IgG4, S228P | 55 | TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT<br>FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVESK<br>YGPCCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPE<br>VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVHLQDGLWNGKEY<br>KCKVSNKGLPSSIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV<br>KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGGSFFLYSRLTVDKSRWQ<br>EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK |
| Domeniul constant al lanțului ușor kappa         | 56 | VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN<br>SQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSPVTKS<br>FNRGEC                                                                                                                                                                                                                                             |
| 28H5 H - CDR1                                    | 57 | GYSITSDYAWN                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 28H5 H - CDR2                                    | 58 | YISNSGSASYNPSLKS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 28H5 H - CDR3                                    | 59 | LIYYDYGGAMNF                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 28H5 L - CDR1                                    | 60 | KASQGVSTTVA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 28H5 L - CDR2                                    | 61 | SASYRYT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 28H5 L - CDR3                                    | 62 | QHYYSTPWT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 28H5<br>VH PARENTALĂ                             | 63 | DVQLQESGPGLVKPSQSLTCTVTGYSITSDYAWNWRQFPGNKLEWM<br>GYISNSGSASYNPSLKSRSITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCATLIY<br>YDYGGAMNFWGQGSVTVSS                                                                                                                                                                                                                                 |
| 28H5<br>VL PARENTALĂ                             | 64 | DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQGVSTTVAWYQQKPGQSPKLLIY<br>SASYRYTGVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQSEDLAVYYCQHYYSTPWTFG<br>GGTKLEIK                                                                                                                                                                                                                                          |
| 14H6 L – varianta CDR2                           | 65 | YASNLQT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 14H6 L – varianta CDR2                           | 65 | YASSLQT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 14H6 L – varianta CDR2                           | 67 | YASTLQT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 14H6 L – varianta CDR2                           | 68 | YATTLQT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 14H6 L – varianta CDR2                           | 69 | YASYLQT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 14H6 L – varianta CDR2                           | 70 | YANQLQT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 14H6 L – varianta CDR2                           | 71 | YAGSLQT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 14H6 L – varianta CDR2                           | 72 | YASQLQT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 14H6 L – varianta CDR2                           | 73 | YADSLQT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 14H6 L – varianta CDR3                           | 74 | QQYYSGFT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 14H6 L – varianta CDR3                           | 75 | QQYYSGYT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 14H6 L – varianta CDR3                           | 76 | QQYYSGIT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 14H6 L – varianta CDR3                           | 77 | QQYYSGVT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 14H6 L – varianta CDR3                           | 78 | QQYYSGLT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |

|                                                |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|------------------------------------------------|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 14H6 H – varianta CDR3                         | 79 | MPSFITLASLSTFEGYFDF                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 14H6 H – varianta CDR3                         | 80 | MPSFITLASLSTYEGYFDF                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 14H6 H – varianta CDR3                         | 81 | MPSFITLASLSTIEGYFDF                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 14H6 H – varianta CDR3                         | 82 | MPSFITLASLSTVEGYFDF                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 14H6 H – varianta CDR3                         | 83 | MPSFITLASLSTLEGYFDF                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Acidul nucleic care codifică VH parentală 28H5 | 84 | GATGTGCAGCTTCAGGAGTCGGGACCTGGCCTGGTGAAACCTTCTCA GTCTCTGTCCCTCACCTGCACTGTCACTGGCTACTCAATCACCAGTGA TTATGCCTGGAAGTGGATCCGACAGTTTCCAGGAAACAACTGGAGT GGATGGGCTACATAAGCAACAGTGGTAGCGCTAGCTACAACCCATCT CTCAAAAGTCGCATCTCTATCACTCGAGACACATCCAAGAACCAGTT CTTCTGTCAGTTGAATTCTGTGACTACTGAGGACACAGCCACATATTA CTGTGCAACCCTGATCTACTATGATTACGGGGGGGCTATGAACTTCTG GGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA |
| Acidul nucleic care codifică VL parentală 28H5 | 85 | GACATTGTGATGACCCAGTCTCACAAATTCATGTCCACATCAGTAGG AGACAGGGTCAGCATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGGTGTGAGTACTA CTGTGGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACTACTG ATTTACTCGGCATCCTACCGGTACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACT GGCAGTGGATCTGGGACGGATTTCACTTTCACCATCAGCAGTGTGCA GTCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGCATTATTATAGTACTCC GTGGACGTTCCGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA                                           |
| Domeniul constant al lanțului greu – IgG1      | 86 | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFNFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK                                  |
| hTIGIT-HIS                                     | 87 | GTIETT GNISAEKGG S IILQCHLSST TAQVTQVNWE QQDQLLAICN ADLGWHISPS FKDRVAPGPG LGLTLQSLTV NDTGEYFCIY HTYPDGTYTGRIFLEVLESS VAEHGARFQI PLLGA HHHHHHHHHHGGQ                                                                                                                                                                                                                               |
| 31C6 H - CDR1                                  | 88 | SYVMH                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 31C6 H - CDR2                                  | 89 | YIDPYNDGAKYNEKFKG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 31C6 H - CDR3                                  | 90 | GGPYGWYFDV                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 31C6 L - CDR1                                  | 91 | RASEHIYSYLS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 31C6 L - CDR2                                  | 92 | NAKTLAE                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 31C6 L - CDR3                                  | 93 | QHHFGSPLT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 31C6 VH PARENTALĂ (cu CDR-uri subliniate)      | 94 | EVQLQQSGPELVKPGSSVKMSCKASGYTFSSYVMHWWVKQKPGQGLEWI GYIDPYNDGAKYNEKFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCA RGGPYGWYFDVWGAGTTVTVSS                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 31C6 VL PARENTALĂ (cu CDR-uri subliniate)      | 95 | DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASEHIYSYLSWYQQKQKGKSPQLLVYN AKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLOPEDFGTYTCQHHFGSPLTFGA GTTLELK                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 31C6 H – VARIANTA CDR2 (D56R)                  | 96 | YIDPYNrGAKYNEKFG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 31C6 H – VARIANTA CDR2 (D56L)                  | 97 | YIDPYNIGAKYNEKG F                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 31C6 H – VARIANTA CDR2 (D56K)                  | 98 | YIDPYNkGAKYNEKFG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |

# MD 4733 C1 2021.07.31

93

|                                     |     |                   |
|-------------------------------------|-----|-------------------|
| 31C6 H –<br>VARIANTA<br>CDR2 (D56F) | 99  | YIDPYNfGAKYNEKFG  |
| 31C6 H –<br>VARIANTA<br>CDR2 (D56S) | 100 | YIDPYNsGAKYNEKFG  |
| 31C6 H –<br>VARIANTA<br>CDR2 (D56Y) | 101 | YIDPYNyGAKYNEKFG  |
| 31C6 H –<br>VARIANTA<br>CDR2 (D56V) | 102 | YIDPYNvGAKYNEKFG  |
| 31C6 H –<br>VARIANTA<br>CDR2 (G57R) | 103 | YIDPYNDrAKYNEKFKG |
| 31C6 H –<br>VARIANTA<br>CDR2 (G57N) | 104 | YIDPYNDnAKYNEKFKG |
| 31C6 H –<br>VARIANTA<br>CDR2 (G57Q) | 105 | YIDPYNDqAKYNEKFKG |
| 31C6 H –<br>VARIANTA<br>CDR2 (G57E) | 106 | YIDPYNDeAKYNEKFKG |
| 31C6 H –<br>VARIANTA<br>CDR2 (G57L) | 107 | YIDPYNDIAKYNEKFKG |
| 31C6 H –<br>VARIANTA<br>CDR2 (G57K) | 108 | YIDPYNDkAKYNEKFKG |
| 31C6 H –<br>VARIANTA<br>CDR2 (G57S) | 109 | YIDPYNDsAKYNEKFKG |
| 31C6 H –<br>VARIANTA<br>CDR2 (G57Y) | 110 | YIDPYNDyAKYNEKFKG |
| 31C6 H –<br>VARIANTA<br>CDR2 (G57V) | 111 | YIDPYNDvAKYNEKFKG |
| 31C6 L – varianta<br>CDR2 (N50A)    | 112 | AAKTLAE           |
| 31C6 L – varianta<br>CDR2 (N50Y)    | 113 | YAKTLAE           |
| 31C6 L – CDR2<br>(N50W)             | 114 | WAKTLAE           |
| 31C6 L – varianta<br>CDR2 (N50S)    | 115 | SAKTLAE           |
| 31C6 L – varianta<br>CDR2 (N50T)    | 116 | TAKTLAE           |
| 31C6 L – varianta<br>CDR2 (N50I)    | 117 | IAKTLAE           |
| 31C6 L – varianta<br>CDR2 (N50V)    | 118 | VAKTLAE           |
| 31C6 L – varianta<br>CDR2 (A51N)    | 119 | NNKTLAE           |
| 31C6 L – varianta<br>CDR2 (A51I)    | 120 | NIKTLAE           |

|                                           |     |                                                                                                                                    |
|-------------------------------------------|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 31C6 L – varianta CDR2 (A51L)             | 121 | NLLTLAE                                                                                                                            |
| 31C6 L – varianta CDR2 (A51T)             | 122 | NTKTLAE                                                                                                                            |
| 31C6 L – varianta CDR2 (A51V)             | 123 | NVKTALAE                                                                                                                           |
| 31C6_HUMZ_VH 1<br>(cu CDR-uri subliniate) | 124 | EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSSYVMHWVRQAPGQRLEW<br>IGYIDPYNDGAKYSQKFQGRVTLTRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYC<br>ARGGPYGWYFDVWGQGTITVTVSS   |
| 31C6_HUMZ_VH 2<br>(cu CDR-uri subliniate) | 125 | EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSSYVMHWVRQAPGQRLEW<br>IGYIDPYNDGAKYSQKFQGRVTLTSDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYC<br>ARGGPYGWYFDVWGQGTITVTVSS   |
| 31C6_HUMZ_VH 3<br>(cu CDR-uri subliniate) | 126 | EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSSYVMHWVRQAPGQGLEW<br>IGYIDPYNDGAKYAQKFQGRVTLTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYC<br>ARGGPYGWYFDVWGQGTITVTVSS   |
| 31C6_HUMZ_VH 4<br>(cu CDR-uri subliniate) | 127 | EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSSYVMHWVRQAPGQGLEW<br>IGYIDPYNDGAKYAQKFQGRVTLTSDKSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYC<br>ARGGPYGWYFDVWGQGTITVTVSS   |
| 31C6_HUMZ_VH 5<br>(cu CDR-uri subliniate) | 128 | EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSYVMHWVRQAPGQGLEWI<br>GYIDPYNDGAKYAQKFQGRVTLTSDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC<br>ARGGPYGWYFDVWGQGTITVTVSS   |
| 31C6_HUMZ_VH 6<br>(cu CDR-uri subliniate) | 129 | EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSSYVMHWVRQAPGQGLEW<br>IGYIDPYNDGAKYAQKFQGRVTLTSDKSISTAYMELSLRSDDTVYYC<br>ARGGPYGWYFDVWGQGTITVTVSS     |
| 31C6_Humz_L1<br>(cu CDR-uri subliniate)   | 130 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEHIYSYLSWYQQKPGKAPKLLIYN<br>AKTLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHFFGSPLTFGQG<br>TRLEIK                 |
| 31C6_Humz_L2<br>(cu CDR-uri subliniate)   | 131 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEHIYSYLSWYQQKPGKAPKLLIYN<br>AKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFTLTISLQPEDFATYYCQHFFGSPLTFGQG<br>TRLEIK                 |
| 31C6_Humz_L3<br>(cu CDR-uri subliniate)   | 132 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEHIYSYLSWYQQKPGKVPKLLIYN<br>AKTLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQHFFGSPLTFGQ<br>GTRLEIK                 |
| 31C6_Humz_L4<br>(cu CDR-uri subliniate)   | 133 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEHIYSYLSWYQQKPGKVPKLLIYN<br>AKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFTLTISLQPEDVATYYCQHFFGSPLTFGQ<br>GTRLEIK                 |
| 31C6 H – varianta CDR2                    | 134 | YIDPYNDGAKYAQKFQG                                                                                                                  |
| 31C6 H – varianta CDR2                    | 135 | YIDPYNDGAKYSQKFQG                                                                                                                  |
| 18G10 – secvența VH                       | 136 | QVQLMESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFPLTSYTVHWVRQPPGKGLEWIG<br>AIWSSGSTDYNSALKSRNLNIRDSSKSQVFLKMNSLQTEDTAIFYCTKSG<br>WAFFDYWGQGVMTVSS         |
| 18G10 – secvența VL                       | 137 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTNLCIASQNIYKSLAWYQLKLGEAPKLLIYN<br>ANSLQAGIPSRFSGSGSGTDFALTISGLQPEDVATYFCQQYSGGYTFGAG<br>TKLELK                 |
| 11A11 – secvența VH                       | 138 | EVQLVESGGDLVQPGRSLKISCVASGFTFSDYYMAWVRLAPQKGLEWV<br>ASISYEGSRTHYGDSVRGRFIISRDNPKNILYLQMNLSLGSSEDTATYFCAR<br>HTGTLDWL VYWGQGTIVIVSS |
| 11A11 – secvența VL                       | 139 | NIVMAQSPKSMISAGDRVTMNCASQNVDDNIAWYQQKPGQSPKLLIF<br>YASNRYSGVPDRFTGGGYGTDFTLTIKSVQAEDAAFYCYQRIYNFPTFGS<br>GTKLEIK                   |

# MD 4733 C1 2021.07.31

95

|                                         |   |     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-----------------------------------------|---|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 14A6 H<br>CONSENSUS<br>CDR3             | - | 140 | MPSFITLASLSTXEGYFDF<br>X= W, F, Y, I, V, L                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 14A6 L<br>CONSENSUS<br>CDR2             | - | 141 | YAX <sub>1</sub> X <sub>2</sub> LQT<br>X <sub>1</sub> = N, S, T, G, D<br>X <sub>2</sub> = S, N, S, T, Y, Q                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 14A6 L<br>CONSENSUS<br>CDR3             | - | 142 | QQYYSGXT<br>X= W, F, Y, I, V, L                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 14A6<br>VH<br>PARENTALĂ de<br>CONSENSUS |   | 143 | EVQLQX <sub>1</sub> SGX <sub>2</sub> GLX <sub>3</sub> KPX <sub>4</sub> X <sub>5</sub> X <sub>6</sub> LSLTCX <sub>7</sub> VX <sub>8</sub> GX <sub>30</sub> SIX <sub>31</sub> SDYWGWX <sub>9</sub> RX <sub>10</sub> X <sub>11</sub> PGX <sub>12</sub> X <sub>13</sub> X <sub>14</sub> EWX <sub>15</sub> GFITYSGSTSYNPSLKSXR <sub>16</sub> X <sub>17</sub> IX <sub>18</sub> X <sub>19</sub> DTSKNQFX <sub>20</sub> LX <sub>21</sub> LX <sub>22</sub> SVTX <sub>23</sub> X <sub>24</sub> DTAX <sub>25</sub> YX <sub>26</sub> CARMPSFITLASLSTX <sub>27</sub> EGYFDFWGX <sub>32</sub> GTX <sub>28</sub> X <sub>29</sub> TVSS<br>X <sub>1</sub> = E sau Q<br>X <sub>2</sub> = P sau A<br>X <sub>3</sub> = V sau L<br>X <sub>4</sub> = S sau P<br>X <sub>5</sub> = Q sau E sau G<br>X <sub>6</sub> = S sau T<br>X <sub>7</sub> = S sau T sau A<br>X <sub>8</sub> = T sau S<br>X <sub>9</sub> = I sau V<br>X <sub>10</sub> = K sau Q<br>X <sub>11</sub> = F sau P<br>X <sub>12</sub> = N sau K<br>X <sub>13</sub> = K sau G<br>X <sub>14</sub> = M sau L<br>X <sub>15</sub> = M sau I<br>X <sub>16</sub> = I sau V<br>X <sub>17</sub> = S sau T<br>X <sub>18</sub> = T sau S<br>X <sub>19</sub> = R sau V<br>X <sub>20</sub> = F sau S<br>X <sub>21</sub> = Q sau K<br>X <sub>22</sub> = H sau S<br>X <sub>23</sub> = T sau A<br>X <sub>24</sub> = D sau A<br>X <sub>25</sub> = T sau V<br>X <sub>26</sub> = S sau Y,<br>X <sub>27</sub> = W, F, Y, I, V sau L<br>X <sub>28</sub> = M, V, L, A, R, N, P, Q, E, G, I, H, K, F, S, T, W sau Y<br>X <sub>29</sub> = V, T sau L<br>X <sub>30</sub> = S sau G sau Y<br>X <sub>31</sub> = A sau S<br>X <sub>31</sub> = P sau Q |
| 14A6<br>VH<br>UMANIZATĂ de<br>CONSENSUS |   | 144 | EVQLQX <sub>1</sub> SGX <sub>2</sub> GLX <sub>3</sub> KPX <sub>4</sub> X <sub>5</sub> TLSLTCX <sub>6</sub> VX <sub>7</sub> GX <sub>8</sub> SIX <sub>9</sub> SDYWGWX <sub>10</sub> RX <sub>11</sub> X <sub>12</sub> PGKX <sub>13</sub> X <sub>14</sub> EWX <sub>15</sub> GFITYSGSTSYNPSLKSXR <sub>16</sub> TISX <sub>17</sub> DTSKNQFSLKLX <sub>18</sub> SVTAX <sub>19</sub> DTAVYYCARMPSFITLASLSTX <sub>20</sub> EGYFDFWQGTX <sub>21</sub> X <sub>22</sub> TVSS<br>X <sub>1</sub> = E sau Q<br>X <sub>2</sub> = P sau A<br>X <sub>3</sub> = V sau L<br>X <sub>4</sub> = S sau P<br>X <sub>5</sub> = E sau G<br>X <sub>6</sub> = T sau A sau S<br>X <sub>7</sub> = S sau T<br>X <sub>8</sub> = G sau S sau Y<br>X <sub>9</sub> = S sau A<br>X <sub>10</sub> = I sau V<br>X <sub>11</sub> = Q sau K                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |

|                                         |     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|-----------------------------------------|-----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                         |     | <p> <math>X_{12} = P</math> sau <math>F</math><br/> <math>X_{13} = G</math> sau <math>K</math><br/> <math>X_{14} = L</math> sau <math>M</math><br/> <math>X_{15} = I</math> sau <math>M</math><br/> <math>X_{16} = V</math> sau <math>I</math><br/> <math>X_{17} = V</math> sau <math>R</math><br/> <math>X_{18} = S</math> sau <math>H</math><br/> <math>X_{19} = A</math> sau <math>D</math><br/> <math>X_{20} = W, F, Y, I, V, L</math><br/> <math>X_{21} = M, V, L, A, R, N, P, Q, E, G, I, H, K, F, S, T, W</math> sau <math>Y</math><br/> <math>X_{22} = V, T</math> sau <math>L</math> </p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 14A6<br>VL PARENTALĂ<br>De CONSENSUS    | 145 | <p> <math>DIQMTQSPSX_1LSASVGDRVTX_2X_3CKASQSIHKNLAWYQQKX_4GX_5X_{15}PK</math><br/> <math>X_6LIYYAX_7X_8LQTGX_9PSRFSGSGSGTDFTLTISX_{10}LQPEDX_{11}ATYX_{12}CQQ</math><br/> <math>YYSGX_{13}TFGGGTKEVEX_{14}K</math><br/> <math>X_1 = L</math> sau <math>S</math><br/> <math>X_2 = L</math> sau <math>I</math><br/> <math>X_3 = N</math> sau <math>T</math><br/> <math>X_4 = L</math> sau <math>P</math><br/> <math>X_5 = E</math> sau <math>K</math><br/> <math>X_6 = F</math> sau <math>L</math><br/> <math>X_7 = N, S, T, G</math> sau <math>D</math><br/> <math>X_8 = S, N, T, Y</math> sau <math>Q</math><br/> <math>X_9 = I</math> sau <math>V</math><br/> <math>X_{10} = G</math> sau <math>S</math><br/> <math>X_{11} = V</math> sau <math>F</math><br/> <math>X_{12} = F</math> sau <math>Y</math><br/> <math>X_{13} = W, F, Y, I, V</math> sau <math>L</math><br/> <math>X_{14} = L</math> sau <math>I</math><br/> <math>X_{15} = A</math> sau <math>V</math> </p> |
| 14A6<br>VL UMANIZATĂ<br>de CONSENSUS    | 146 | <p> <math>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSIHKNLAWYQQKPGKX_6PKX_1LIY</math><br/> <math>YAX_2X_3LQTGX_4PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDX_7ATYYCQQYYSGX_5T</math><br/> <math>FGGGTKVEIK</math><br/> <math>X_1 = L</math> sau <math>F</math><br/> <math>X_2 = N, S, T, G</math> sau <math>D</math><br/> <math>X_3 = S, N, T, Y</math> sau <math>Q</math><br/> <math>X_4 = V</math> sau <math>I</math><br/> <math>X_5 = W, F, Y, I, V</math> sau <math>L</math><br/> <math>X_6 = A</math> sau <math>V</math><br/> <math>X_7 = F</math> sau <math>V</math> </p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 31C6 H - CDR2<br>CONSENSUS              | 147 | <p> <math>YIDPYNX_1X_2AKYX_3X_4KFX_5G</math><br/> <math>X_1 = D, R, L, K, F, S, Y</math> sau <math>V</math><br/> <math>X_2 = G, R, N, Q, E, L, K, S, Y</math> sau <math>V</math><br/> <math>X_3 = N, A</math> sau <math>S</math><br/> <math>X_4 = E</math> sau <math>Q</math><br/> <math>X_5 = K</math> sau <math>Q</math> </p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 31C6 L – CDR2<br>CONSENSUS              | 148 | <p> <math>X_1X_2KTLAE</math><br/> <math>X_1 = N, A, V, W, S, T, R, H, G, I</math> sau <math>V</math><br/> <math>X_2 = A, N, I, L, T</math> sau <math>V</math> </p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 31C6<br>VH<br>PARENTALĂ de<br>CONSENSUS | 149 | <p> <math>EVQLX_1QSGX_2EX_3X_4KPGX_5SVKX_6SCKASGYTFSSYYVMHWVX_7QX_8PGQ</math><br/> <math>X_9LEWIGYIDPYN</math><br/> <math>X_{10}X_{11}AKYX_{12}X_{13}KFX_{14}GX_{15}X_{16}TLTX_{17}DX_{18}SX_{19}STX_{20}YMELSX_{21}LX_{22}SX_{23}</math><br/> <math>DX_{24}X_{25}VYYCARGGPYGX_{26}YFDVWGX_{27}GTTVTVSS</math><br/> <math>X_1 = Q</math> sau <math>V</math><br/> <math>X_2 = P</math> sau <math>A</math><br/> <math>X_3 = V</math> sau <math>L</math><br/> <math>X_4 = V</math> sau <math>K</math><br/> <math>X_5 = S</math> sau <math>A</math><br/> <math>X_6 = M</math> sau <math>V</math> </p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |

|                                      |     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|--------------------------------------|-----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                      |     | <p> <math>X_7 = K</math> sau <math>R</math><br/> <math>X_8 = K</math> sau <math>A</math><br/> <math>X_9 = G</math> sau <math>R</math><br/> <math>X_{10} = D, R, L, K, F, S, Y</math> sau <math>V</math><br/> <math>X_{11} = G, R, N, Q, E, L, K, S, Y</math> sau <math>V</math><br/> <math>X_{12} = N, A</math> sau <math>S</math><br/> <math>X_{13} = E</math> sau <math>Q</math><br/> <math>X_{14} = K</math> sau <math>Q</math><br/> <math>X_{15} = R</math> sau <math>K</math><br/> <math>X_{16} = A</math> sau <math>V</math><br/> <math>X_{17} = S</math> sau <math>R</math><br/> <math>X_{18} = K</math> sau <math>T</math><br/> <math>X_{19} = S, I, A</math> sau <math>T</math><br/> <math>X_{20} = A</math> sau <math>V</math><br/> <math>X_{21} = R</math> sau <math>S</math><br/> <math>X_{22} = T</math> sau <math>R</math><br/> <math>X_{23} = D</math> sau <math>E</math><br/> <math>X_{24} = S</math> sau <math>T</math><br/> <math>X_{25} = A</math> sau <math>V</math><br/> <math>X_{26} = W, A, D, E, F, G, I, K, N, Q, R, S, T, V</math> sau <math>Y</math><br/> <math>X_{27} = A</math> sau <math>Q</math> </p> |
| 31C6<br>VH UMANIZATĂ<br>De CONSENSUS | 150 | <p> <math>EVQLVQSGAEVKKPGX_1SVKVSCKASGYTFSSYVMHWVRQAPGX_2LE</math><br/> <math>WIG</math><br/> <math>YIDPYNX_3X_4AKYX_5X_5KFX_7GRVTLTX_8DX_9SX_{10}STX_{11}YMELSX_{12}LRSX_{13}D</math><br/> <math>T X_{14}VYYCARGGPYGX_{15}YFDVWGQGTTVTVSS</math><br/> <math>X_1 = A</math> sau <math>S</math><br/> <math>X_2 = R</math> sau <math>G</math><br/> <math>X_3 = D, R, L, K, F, S, Y</math> sau <math>V</math><br/> <math>X_4 = G, R, N, Q, E, L, K, S, Y</math> sau <math>V</math><br/> <math>X_5 = N, A</math> sau <math>S</math><br/> <math>X_6 = E</math> sau <math>Q</math><br/> <math>X_7 = K</math> sau <math>Q</math><br/> <math>X_8 = R</math> sau <math>S</math><br/> <math>X_9 = T</math> sau <math>K</math><br/> <math>X_{10} = A, T</math> sau <math>I</math><br/> <math>X_{11} = A</math> sau <math>V</math><br/> <math>X_{12} = S</math> sau <math>R</math><br/> <math>X_{13} = E</math> sau <math>D</math><br/> <math>X_{14} = A</math> sau <math>V</math><br/> <math>X_{15} = W, A, D, E, F, G, I, K, N, Q, R, S, T, V</math> sau <math>Y</math> </p>                                                                   |
| 31C6<br>VL PARENTALĂ<br>De CONSENSUS | 151 | <p> <math>DIQMTQSPX_1SLSASVGX_2X_3VTITCRASEHIYSYLSWYQQKX_4GKX_5PX_6L</math><br/> <math>LX_7YX_8X_9KTLAEGVPSRFSGSGTX_{10}FX_{11}LX_{12}IX_{13}SLQPEDX_{14}X_{15}TYYC</math><br/> <math>QHHFGSPLTFGX_{16}GTX_{17}LEX_{18}K</math><br/> <math>X_1 = A</math> sau <math>S</math><br/> <math>X_2 = E</math> sau <math>D</math><br/> <math>X_3 = T</math> sau <math>R</math><br/> <math>X_4 = Q</math> sau <math>P</math><br/> <math>X_5 = S, A</math> sau <math>V</math><br/> <math>X_6 = Q</math> sau <math>K</math><br/> <math>X_7 = V</math> sau <math>I</math><br/> <math>X_8 = N, A, Y, W, S, T, I</math> sau <math>V</math><br/> <math>X_9 = A, N, I, L, T</math> sau <math>V</math><br/> <math>X_{10} = Q</math> sau <math>D</math><br/> <math>X_{11} = S</math> sau <math>T</math><br/> <math>X_{12} = K</math> sau <math>T</math><br/> <math>X_{13} = N</math> sau <math>S</math><br/> <math>X_{14} = F</math> sau <math>V</math><br/> <math>X_{15} = G</math> sau <math>A</math><br/> <math>X_{16} = A</math> sau <math>Q</math> </p>                                                                                           |

# MD 4733 C1 2021.07.31

98

|                                          |     |   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|------------------------------------------|-----|---|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                          |     |   | $X_{17} = T$ sau $R$<br>$X_{18} = L$ sau $I$                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 31C6 L – VL<br>UMANIZATĂ de<br>CONSENSUS | 152 |   | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEHIYSYLSWYQQKPGKX <sub>1</sub> PKLLIY<br>$X_2X_3$ KTLAEGVPSRFSGSGSGTX <sub>4</sub> FTLTISSLQPEDX <sub>5</sub> ATYYCQHFGSPLT<br>FGQGTRLEIK<br>$X_1 = A$ sau $V$<br>$X_2 = N, A, W, W, S, T, I$ sau $V$<br>$X_3 = A, N, I, L, T$ sau $V$<br>$X_4 = D$ sau $Q$<br>$X_5 = F$ sau $V$ |
| 31C6 H - CDR3<br>CONSENSUS               | 153 |   | GGPYGYFDV<br>$X_{15} = W, A, D, E, F, G, I, K, N, Q, R, S, T, V$ sau $Y$                                                                                                                                                                                                                                   |
| 31C6 H -<br>VARIANTA<br>CDR3             | 154 | - | GGPYGAYFDV                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 31C6 H -<br>VARIANTA<br>CDR3             | 155 | - | GGPYGDYFDV                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 31C6 H -<br>VARIANTA<br>CDR3             | 156 | - | GGPYGEYFDV                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 31C6 H -<br>VARIANTA<br>CDR3             | 157 | - | GGPYGFYFDV                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 31C6 H -<br>VARIANTA<br>CDR3             | 158 | - | GGPYGGYFDV                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 31C6 H -<br>VARIANTA<br>CDR3             | 159 | - | GGPYGIYFDV                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 31C6 H -<br>VARIANTA<br>CDR3             | 160 | - | GGPYGKYFDV                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 31C6 H -<br>VARIANTA<br>CDR3             | 161 | - | GGPYGNYFDV                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 31C6 H -<br>VARIANTA<br>CDR3             | 162 | - | GGPYGQYFDV                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 31C6 H -<br>VARIANTA<br>CDR3             | 163 | - | GGPYGRYFDV                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 31C6 H -<br>VARIANTA<br>CDR3             | 164 | - | GGPYGSYFDV                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 31C6 H -<br>VARIANTA<br>CDR3             | 165 | - | GGPYGTYFDV                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 31C6 H -<br>VARIANTA<br>CDR3             | 166 | - | GGPYGVYFDV                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 31C6 H -<br>VARIANTA<br>CDR3             | 167 | - | GGPYGYFDV                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |

## LISTA SECVENȚELOR

<110> WILLIAMS, SYBIL M. G.  
 LAFACE, DRAKE  
 FAYADAT-DILMAN, LAURENCE  
 RAGHUNATHAN, GOPALAN  
 LIANG, LINDA  
 SEGHEZZI, WOLFGANG

<120> ANTICORPI ANTI-TIGIT

<130> 23808-US-PCT

<140>  
 <141>

<150> 62/126,733  
 <151> 2015-03-02

<150> 62/038,912  
 <151> 2014-08-19

<160> 167

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secvență artificială

<220>  
 <223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 1  
 Ser Asp Tyr Trp Gly  
 1 5

<210> 2  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secvență artificială

<220>  
 <223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 2  
 Phe Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
 1 5 10 15

<210> 3  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Secvență artificială

<220>  
 <223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 3  
 Met Pro Ser Phe Ile Thr Leu Ala Ser Leu Ser Thr Trp Glu Gly Tyr  
 1 5 10 15

# MD 4733 C1 2021.07.31

100

Phe Asp Phe

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 4

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Lys | Ala | Ser | Gln | Ser | Ile | His | Lys | Asn | Leu | Ala |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 5

|     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Tyr | Ala | Asn | Ser | Leu | Gln | Thr |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 6

|     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Gln | Tyr | Tyr | Ser | Gly | Trp | Thr |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |

<210> 7

<211> 127

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 7

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Val | Gln | Leu | Gln | Glu | Ser | Gly | Pro | Gly | Leu | Val | Lys | Pro | Ser | Gln |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Leu | Ser | Leu | Thr | Cys | Ser | Val | Thr | Gly | Ser | Ser | Ile | Ala | Ser | Asp |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     |     | 30  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Tyr | Trp | Gly | Trp | Ile | Arg | Lys | Phe | Pro | Gly | Asn | Lys | Met | Glu | Trp | Met |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Phe | Ile | Thr | Tyr | Ser | Gly | Ser | Thr | Ser | Tyr | Asn | Pro | Ser | Leu | Lys |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |

# MD 4733 C1 2021.07.31

101

Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe Leu  
65 70 75 80

Gln Leu His Ser Val Thr Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Ser Cys Ala  
85 90 95

Arg Met Pro Ser Phe Ile Thr Leu Ala Ser Leu Ser Thr Trp Glu Gly  
100 105 110

Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Pro Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 8

<211> 106

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 8

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Leu Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Leu Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Ile His Lys Asn  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Leu Gly Glu Ala Pro Lys Phe Leu Ile  
35 40 45

Tyr Tyr Ala Asn Ser Leu Gln Thr Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Gly Trp Thr  
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Leu Lys  
100 105

<210> 9

<211> 127

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Lanț polipeptidic al anticorpului umanizat

<400> 9

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Asp

# MD 4733 C1 2021.07.31

102

| 20                                                            |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |  |  |  |  |
|---------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|
| Tyr                                                           | Trp | Gly | Trp | Ile | Arg | Gln | Pro | Pro | Gly | Lys | Gly | Leu | Glu | Trp | Ile |  |  |  |  |
|                                                               |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |  |  |  |  |
| Gly                                                           | Phe | Ile | Thr | Tyr | Ser | Gly | Ser | Thr | Ser | Tyr | Asn | Pro | Ser | Leu | Lys |  |  |  |  |
|                                                               |     | 50  |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Ser                                                           | Arg | Val | Thr | Ile | Ser | Val | Asp | Thr | Ser | Lys | Asn | Gln | Phe | Ser | Leu |  |  |  |  |
| 65                                                            |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |  |  |  |  |
| Lys                                                           | Leu | Ser | Ser | Val | Thr | Ala | Ala | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | Ala |  |  |  |  |
|                                                               |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |  |  |  |  |
| Arg                                                           | Met | Pro | Ser | Phe | Ile | Thr | Leu | Ala | Ser | Leu | Ser | Thr | Trp | Glu | Gly |  |  |  |  |
|                                                               |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     |     | 110 |     |  |  |  |  |
| Tyr                                                           | Phe | Asp | Phe | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Met | Val | Thr | Val | Ser | Ser |     |  |  |  |  |
|                                                               |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |  |  |  |  |
| <210> 10                                                      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| <211> 127                                                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| <212> PRT                                                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| <213> Secvență artificială                                    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| <220>                                                         |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| <223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Lanț polipeptidic al anticorpului umanizat                    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| <400> 10                                                      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Glu                                                           | Val | Gln | Leu | Gln | Glu | Ser | Gly | Pro | Gly | Leu | Val | Lys | Pro | Ser | Glu |  |  |  |  |
| 1                                                             |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     | 15  |     |  |  |  |  |
| Thr                                                           | Leu | Ser | Leu | Thr | Cys | Thr | Val | Ser | Gly | Gly | Ser | Ile | Ser | Ser | Asp |  |  |  |  |
|                                                               |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |  |  |  |  |
| Tyr                                                           | Trp | Gly | Trp | Ile | Arg | Gln | Pro | Pro | Gly | Lys | Gly | Leu | Glu | Trp | Ile |  |  |  |  |
|                                                               |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |  |  |  |  |
| Gly                                                           | Phe | Ile | Thr | Tyr | Ser | Gly | Ser | Thr | Ser | Tyr | Asn | Pro | Ser | Leu | Lys |  |  |  |  |
|                                                               |     | 50  |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Ser                                                           | Arg | Val | Thr | Ile | Ser | Arg | Asp | Thr | Ser | Lys | Asn | Gln | Phe | Ser | Leu |  |  |  |  |
| 65                                                            |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |  |  |  |  |
| Lys                                                           | Leu | Ser | Ser | Val | Thr | Ala | Ala | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | Ala |  |  |  |  |
|                                                               |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |  |  |  |  |
| Arg                                                           | Met | Pro | Ser | Phe | Ile | Thr | Leu | Ala | Ser | Leu | Ser | Thr | Trp | Glu | Gly |  |  |  |  |
|                                                               |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     |     | 110 |     |  |  |  |  |
| Tyr                                                           | Phe | Asp | Phe | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Met | Val | Thr | Val | Ser | Ser |     |  |  |  |  |
|                                                               |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |  |  |  |  |

# MD 4733 C1 2021.07.31

103

<210> 11

<211> 127

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Lanț polipeptidic al anticorpului umanizat

<400> 11

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Asp  
20 25 30

Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Phe Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Met Pro Ser Phe Ile Thr Leu Ala Ser Leu Ser Thr Trp Glu Gly  
100 105 110

Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 12

<211> 127

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Lanț polipeptidic al anticorpului umanizat

<400> 12

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ser Ser Ile Ser Ser Asp  
20 25 30

Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Phe Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

## MD 4733 C1 2021.07.31

104

50 55 60

Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Met Pro Ser Phe Ile Thr Leu Ala Ser Leu Ser Thr Trp Glu Gly  
100 105 110

Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 13  
<211> 127  
<212> PRT  
<213> Secvență artificială

<220>  
<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Lanț polipeptidic al anticorpului umanizat

<400> 13  
Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Asp  
20 25 30

Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Phe Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
65 70 75 80

Lys Leu His Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Met Pro Ser Phe Ile Thr Leu Ala Ser Leu Ser Thr Trp Glu Gly  
100 105 110

Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

```
<210> 14
<211> 127
<212> PRT
<213> Secvență artificială
<220>
```

# MD 4733 C1 2021.07.31

105

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Lanț polipeptidic al anticorpului umanizat

<400> 14

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Asp  
20 25 30

Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Phe Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
65 70 75 80

Lys Leu His Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Met Pro Ser Phe Ile Thr Leu Ala Ser Leu Ser Thr Trp Glu Gly  
100 105 110

Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 15

<211> 127

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Lanț polipeptidic al anticorpului umanizat

<400> 15

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ser Ser Ile Ser Ser Asp  
20 25 30

Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Phe Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
65 70 75 80

Lys Leu His Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

# MD 4733 C1 2021.07.31

106

85

90

95

Arg Met Pro Ser Phe Ile Thr Leu Ala Ser Leu Ser Thr Trp Glu Gly  
100 105 110

Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 16

<211> 127

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Lanț polipeptidic al anticorpului umanizat

<400> 16

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ser Ser Ile Ser Ser Asp  
20 25 30

Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Phe Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Ile Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
65 70 75 80

Lys Leu His Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Met Pro Ser Phe Ile Thr Leu Ala Ser Leu Ser Thr Trp Glu Gly  
100 105 110

Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 17

<211> 127

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Lanț polipeptidic al anticorpului umanizat

<400> 17

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

# MD 4733 C1 2021.07.31

107

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Asp  
20 25 30

Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Phe Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Met Pro Ser Phe Ile Thr Leu Ala Ser Leu Ser Thr Trp Glu Gly  
100 105 110

Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 18

<211> 127

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Lanț polipeptidic al anticorpului umanizat

<400> 18

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Asp  
20 25 30

Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Phe Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Met Pro Ser Phe Ile Thr Leu Ala Ser Leu Ser Thr Trp Glu Gly  
100 105 110

Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

# MD 4733 C1 2021.07.31

108

115

120

125

<210> 19

<211> 127

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Lanț polipeptidic al anticorpului umanizat

<400> 19

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Asp  
20 25 30

Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Phe Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Met Pro Ser Phe Ile Thr Leu Ala Ser Leu Ser Thr Trp Glu Gly  
100 105 110

Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 20

<211> 127

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Lanț polipeptidic al anticorpului umanizat

<400> 20

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Ser Ser Ile Ser Ser Asp  
20 25 30

Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

# MD 4733 C1 2021.07.31

109

Gly Phe Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Met Pro Ser Phe Ile Thr Leu Ala Ser Leu Ser Thr Trp Glu Gly  
100 105 110

Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 21

<211> 127

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Lanț polipeptidic al anticorpului umanizat

<400> 21

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Asp  
20 25 30

Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Phe Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
65 70 75 80

Lys Leu His Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Met Pro Ser Phe Ile Thr Leu Ala Ser Leu Ser Thr Trp Glu Gly  
100 105 110

Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 22

<211> 127

<212> PRT

<213> Secvență artificială

# MD 4733 C1 2021.07.31

110

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Lanț polipeptidic al anticorpului umanizat

<400> 22

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Asp  
20 25 30

Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Phe Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
65 70 75 80

Lys Leu His Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Met Pro Ser Phe Ile Thr Leu Ala Ser Leu Ser Thr Trp Glu Gly  
100 105 110

Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 23

<211> 127

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Lanț polipeptidic al anticorpului umanizat

<400> 23

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Ser Ser Ile Ser Ser Asp  
20 25 30

Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Phe Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
65 70 75 80

# MD 4733 C1 2021.07.31

111

Lys Leu His Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Met Pro Ser Phe Ile Thr Leu Ala Ser Leu Ser Thr Trp Glu Gly  
100 105 110

Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 24

<211> 127

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Lanț polipeptidic al anticorpului umanizat

<400> 24

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Ser Ser Ile Ser Ser Asp  
20 25 30

Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Phe Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
65 70 75 80

Lys Leu His Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Met Pro Ser Phe Ile Thr Leu Ala Ser Leu Ser Thr Trp Glu Gly  
100 105 110

Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 25

<211> 106

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Lanț polipeptidic al anticorpului umanizat

<400> 25

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

# MD 4733 C1 2021.07.31

112

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Ile His Lys Asn  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Tyr Ala Asn Ser Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Gly Trp Thr  
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 26

<211> 106

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Lanț polipeptidic al anticorpului umanizat

<400> 26

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Ile His Lys Asn  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Phe Leu Ile  
35 40 45

Tyr Tyr Ala Asn Ser Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Gly Trp Thr  
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 27

<211> 106

<212> PRT

<213> Secvență artificială

# MD 4733 C1 2021.07.31

113

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Lanț polipeptidic al anticorpului umanizat

<400> 27

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Ile His Lys Asn  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Phe Leu Ile  
35 40 45

Tyr Tyr Ala Asn Ser Leu Gln Thr Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Gly Trp Thr  
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 28

<211> 106

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Lanț polipeptidic al anticorpului umanizat

<400> 28

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Ile His Lys Asn  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Tyr Ala Asn Ser Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Gly Trp Thr  
85 90 95

# MD 4733 C1 2021.07.31

114

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 29

<211> 106

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Lanț polipeptidic al anticorpului umanizat

<400> 29

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Ile His Lys Asn  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Phe Leu Ile  
35 40 45

Tyr Tyr Ala Asn Ser Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Gly Trp Thr  
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 30

<211> 106

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Lanț polipeptidic al anticorpului umanizat

<400> 30

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Ile His Lys Asn  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Phe Leu Ile  
35 40 45

Tyr Tyr Ala Asn Ser Leu Gln Thr Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

# MD 4733 C1 2021.07.31

115

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Gly Trp Thr  
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 31  
<211> 244  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 31  
Met Arg Trp Cys Leu Leu Leu Ile Trp Ala Gln Gly Leu Arg Gln Ala  
1 5 10 15

Pro Leu Ala Ser Gly Met Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn  
20 25 30

Ile Ser Ala Glu Lys Gly Gly Ser Ile Ile Leu Gln Cys His Leu Ser  
35 40 45

Ser Thr Thr Ala Gln Val Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln Gln Asp Gln  
50 55 60

Leu Leu Ala Ile Cys Asn Ala Asp Leu Gly Trp His Ile Ser Pro Ser  
65 70 75 80

Phe Lys Asp Arg Val Ala Pro Gly Pro Gly Leu Gly Leu Thr Leu Gln  
85 90 95

Ser Leu Thr Val Asn Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Ile Tyr His Thr  
100 105 110

Tyr Pro Asp Gly Thr Tyr Thr Gly Arg Ile Phe Leu Glu Val Leu Glu  
115 120 125

Ser Ser Val Ala Glu His Gly Ala Arg Phe Gln Ile Pro Leu Leu Gly  
130 135 140

Ala Met Ala Ala Thr Leu Val Val Ile Cys Thr Ala Val Ile Val Val  
145 150 155 160

Val Ala Leu Thr Arg Lys Lys Lys Ala Leu Arg Ile His Ser Val Glu  
165 170 175

Gly Asp Leu Arg Arg Lys Ser Ala Gly Gln Glu Glu Trp Ser Pro Ser  
180 185 190

# MD 4733 C1 2021.07.31

116

Ala Pro Ser Pro Pro Gly Ser Cys Val Gln Ala Glu Ala Ala Pro Ala  
195 200 205

Gly Leu Cys Gly Glu Gln Arg Gly Glu Asp Cys Ala Glu Leu His Asp  
210 215 220

Tyr Phe Asn Val Leu Ser Tyr Arg Ser Leu Gly Asn Cys Ser Phe Phe  
225 230 235 240

Thr Glu Thr Gly

<210> 32  
<211> 245  
<212> PRT  
<213> *Macaca fascicularis*

<400> 32  
Met Arg Trp Cys Leu Phe Leu Ile Trp Ala Gln Gly Leu Arg Gln Ala  
1 5 10 15

Pro Leu Ala Ser Gly Met Met Thr Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn  
20 25 30

Ile Ser Ala Lys Lys Gly Gly Ser Val Ile Leu Gln Cys His Leu Ser  
35 40 45

Ser Thr Met Ala Gln Val Thr Gln Val Asn Trp Glu Gln His Asp His  
50 55 60

Ser Leu Leu Ala Ile Arg Asn Ala Glu Leu Gly Trp His Ile Tyr Pro  
65 70 75 80

Ala Phe Lys Asp Arg Val Ala Pro Gly Pro Gly Leu Gly Leu Thr Leu  
85 90 95

Gln Ser Leu Thr Met Asn Asp Thr Gly Glu Tyr Phe Cys Thr Tyr His  
100 105 110

Thr Tyr Pro Asp Gly Thr Tyr Arg Gly Arg Ile Phe Leu Glu Val Leu  
115 120 125

Glu Ser Ser Val Ala Glu His Ser Ala Arg Phe Gln Ile Pro Leu Leu  
130 135 140

Gly Ala Met Ala Met Met Leu Val Val Ile Cys Ile Ala Val Ile Val  
145 150 155 160

Val Val Val Leu Ala Arg Lys Lys Lys Ser Leu Arg Ile His Ser Val  
165 170 175

# MD 4733 C1 2021.07.31

117

Glu Ser Gly Leu Gln Arg Lys Ser Thr Gly Gln Glu Glu Gln Ile Pro  
180 185 190

Ser Ala Pro Ser Pro Pro Gly Ser Cys Val Gln Ala Glu Ala Ala Pro  
195 200 205

Ala Gly Leu Cys Gly Glu Gln Gln Gly Asp Asp Cys Ala Glu Leu His  
210 215 220

Asp Tyr Phe Asn Val Leu Ser Tyr Arg Ser Leu Gly Ser Cys Ser Phe  
225 230 235 240

Phe Thr Glu Thr Gly  
245

<210> 33

<211> 447

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Lanț polipeptidic al anticorpului

<400> 33

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe  
50 55 60

Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Lys Ser Leu Gln Phe Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala  
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser

# MD 4733 C1 2021.07.31

118

|                                                                 |     |     |     |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 145                                                             |     | 150 |     | 155 |     | 160 |
| Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val |     |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 165 |     |     | 170 |     | 175 |
| Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro |     |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 180 |     | 185 |     |     | 190 |
| Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys |     |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 195 |     | 200 |     |     | 205 |
| Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro |     |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 210 |     | 215 |     |     | 220 |
| Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val |     |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 225 |     | 230 |     |     | 235 |
|                                                                 |     |     |     |     |     | 240 |
| Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr |     |     |     |     |     |     |
|                                                                 |     | 245 |     |     | 250 |     |
|                                                                 |     |     |     |     |     | 255 |
| Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu |     |     |     |     |     |     |
|                                                                 |     | 260 |     |     | 265 |     |
|                                                                 |     |     |     |     |     | 270 |
| Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys |     |     |     |     |     |     |
|                                                                 |     | 275 |     |     | 280 |     |
|                                                                 |     |     |     |     |     | 285 |
| Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser |     |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 290 |     |     |     |     | 300 |
| Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys |     |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 305 |     |     |     |     | 315 |
|                                                                 |     |     |     |     |     | 320 |
| Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile |     |     |     |     |     |     |
|                                                                 |     | 325 |     |     |     | 330 |
|                                                                 |     |     |     |     |     | 335 |
| Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro |     |     |     |     |     |     |
|                                                                 |     | 340 |     |     |     | 345 |
|                                                                 |     |     |     |     |     | 350 |
| Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu |     |     |     |     |     |     |
|                                                                 |     | 355 |     |     |     | 360 |
|                                                                 |     |     |     |     |     | 365 |
| Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn |     |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 370 |     |     |     |     | 375 |
|                                                                 |     |     |     |     |     | 380 |
| Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser |     |     |     |     |     |     |
|                                                                 | 385 |     |     |     |     | 390 |
|                                                                 |     |     |     |     |     | 395 |
|                                                                 |     |     |     |     |     | 400 |
| Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg |     |     |     |     |     |     |
|                                                                 |     | 405 |     |     |     | 410 |
|                                                                 |     |     |     |     |     | 415 |

# MD 4733 C1 2021.07.31

119

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
435 440 445

<210> 34

<211> 218

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Lanț polipeptidic al anticorpului

<400> 34

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser  
20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro  
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala  
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg  
85 90 95

Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro

# MD 4733 C1 2021.07.31

120

195

200

205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210 215

<210> 35

<211> 440

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Lanț polipeptidic al anticorpului

<400> 35

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser  
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
100 105 110

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser  
115 120 125

Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp  
130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr  
145 150 155 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr  
165 170 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys  
180 185 190

Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp  
195 200 205

# MD 4733 C1 2021.07.31

121

Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala  
210 215 220

Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro  
225 230 235 240

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val  
245 250 255

Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val  
260 265 270

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln  
275 280 285

Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln  
290 295 300

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly  
305 310 315 320

Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro  
325 330 335

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr  
340 345 350

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser  
355 360 365

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr  
370 375 380

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr  
385 390 395 400

Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe  
405 410 415

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
420 425 430

Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
435 440

<210> 36

<211> 214

<212> PRT

<213> Secvență artificială

# MD 4733 C1 2021.07.31

122

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Lanț polipeptidic al anticorpului

<400> 36

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 37

<211> 129

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

# MD 4733 C1 2021.07.31

123

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Lanț polipeptidic al anticorpului umanizat

<400> 37

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ser Ser Ile Ala Ser Asp  
20 25 30

Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Phe Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Met Pro Ser Phe Ile Thr Leu Ala Ser Leu Ser Thr Trp Glu Gly  
100 105 110

Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala  
115 120 125

Ser

<210> 38

<211> 127

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Lanț polipeptidic al anticorpului umanizat

<400> 38

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ser Ser Ile Ala Ser Asp  
20 25 30

Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Phe Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu

## MD 4733 C1 2021.07.31

124

65                      70                      75                      80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
                      85                      90                      95

Arg Met Pro Ser Phe Ile Thr Leu Ala Ser Leu Ser Thr Trp Glu Gly  
100 105 110

Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

```
<210> 39
<211> 127
<212> PRT
<213> Secvență artificială
```

<220>  
<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Lanț polipeptidic al anticorpului umanizat

<400> 39  
Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1                  5                  10                  15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ser Ser Ile Ala Ser Asp  
20 25 30

Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Lys Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Phe Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Met Pro Ser Phe Ile Thr Leu Ala Ser Leu Ser Thr Trp Glu Gly  
100 105 110

Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

```
<210> 40
<211> 127
<212> PRT
<213> Secvență artificială
```

<220>  
<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Lanț polipeptidic al anticorpului umanizat

<400> 40

# MD 4733 C1 2021.07.31

125

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ser Ser Ile Ala Ser Asp  
20 25 30

Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Lys Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Phe Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Met Pro Ser Phe Ile Thr Leu Ala Ser Leu Ser Thr Trp Glu Gly  
100 105 110

Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 41

<211> 127

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Lanț polipeptidic al anticorpului umanizat

<400> 41

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ser Ser Ile Ala Ser Asp  
20 25 30

Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Met Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Phe Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Met Pro Ser Phe Ile Thr Leu Ala Ser Leu Ser Thr Trp Glu Gly

# MD 4733 C1 2021.07.31

126

100

105

110

Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 42

<211> 127

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Lanț polipeptidic al anticorpului umanizat

<400> 42

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ser Ser Ile Ala Ser Asp  
20 25 30

Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Lys Pro Pro Gly Lys Lys Met Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Phe Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Met Pro Ser Phe Ile Thr Leu Ala Ser Leu Ser Thr Trp Glu Gly  
100 105 110

Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 43

<211> 127

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Lanț polipeptidic al anticorpului umanizat

<400> 43

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ser Ser Ile Ala Ser Asp  
20 25 30

# MD 4733 C1 2021.07.31

127

Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Phe Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Met Pro Ser Phe Ile Thr Leu Ala Ser Leu Ser Thr Trp Glu Gly  
100 105 110

Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 44

<211> 127

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Lanț polipeptidic al anticorpului umanizat

<400> 44

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ser Ser Ile Ala Ser Asp  
20 25 30

Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Lys Pro Pro Gly Lys Lys Met Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Phe Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Met Pro Ser Phe Ile Thr Leu Ala Ser Leu Ser Thr Trp Glu Gly  
100 105 110

Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 45

# MD 4733 C1 2021.07.31

128

<211> 127

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Lanț polipeptidic al anticorpului umanizat

<400> 45

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Ser Ser Ile Ala Ser Asp  
20 25 30

Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Phe Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Met Pro Ser Phe Ile Thr Leu Ala Ser Leu Ser Thr Trp Glu Gly  
100 105 110

Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 46

<211> 127

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Lanț polipeptidic al anticorpului umanizat

<400> 46

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Ser Ser Ile Ala Ser Asp  
20 25 30

Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Phe Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
50 55 60

# MD 4733 C1 2021.07.31

129

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Met Pro Ser Phe Ile Thr Leu Ala Ser Leu Ser Thr Trp Glu Gly  
100 105 110

Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 47

<211> 127

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Lanț polipeptidic al anticorpului umanizat

<400> 47

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Pro Gly  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Ser Ser Ile Ala Ser Asp  
20 25 30

Tyr Trp Gly Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Phe Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Arg Met Pro Ser Phe Ile Thr Leu Ala Ser Leu Ser Thr Trp Glu Gly  
100 105 110

Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 48

<211> 106

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Lanț polipeptidic al anticorpului umanizat

# MD 4733 C1 2021.07.31

130

<400> 48

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Ile His Lys Asn  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Tyr Ala Asn Ser Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Gly Trp Thr  
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 49

<211> 106

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Lanț polipeptidic al anticorpului umanizat

<400> 49

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Ile His Lys Asn  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Phe Leu Ile  
35 40 45

Tyr Tyr Ala Asn Ser Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Gly Trp Thr  
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

# MD 4733 C1 2021.07.31

131

<210> 50  
<211> 106  
<212> PRT  
<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Lanț polipeptidic al anticorpului umanizat

<400> 50

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Ile | Gln | Met | Thr | Gln | Ser | Pro | Ser | Ser | Leu | Ser | Ala | Ser | Val | Gly |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Arg | Val | Thr | Ile | Thr | Cys | Lys | Ala | Ser | Gln | Ser | Ile | His | Lys | Asn |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Ala | Trp | Tyr | Gln | Gln | Lys | Pro | Gly | Lys | Ala | Pro | Lys | Leu | Leu | Ile |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Tyr | Tyr | Ala | Asn | Ser | Leu | Gln | Thr | Gly | Val | Pro | Ser | Arg | Phe | Ser | Gly |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Gly | Ser | Gly | Thr | Asp | Phe | Thr | Leu | Thr | Ile | Ser | Ser | Leu | Gln | Pro |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Asp | Phe | Ala | Thr | Tyr | Phe | Cys | Gln | Gln | Tyr | Tyr | Ser | Gly | Trp | Thr |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Phe | Gly | Gly | Gly | Thr | Lys | Val | Glu | Ile | Lys |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |

<210> 51  
<211> 106  
<212> PRT  
<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Lanț polipeptidic al anticorpului umanizat

<400> 51

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Ile | Gln | Met | Thr | Gln | Ser | Pro | Ser | Ser | Leu | Ser | Ala | Ser | Val | Gly |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Arg | Val | Thr | Ile | Thr | Cys | Lys | Ala | Ser | Gln | Ser | Ile | His | Lys | Asn |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Ala | Trp | Tyr | Gln | Gln | Lys | Pro | Gly | Lys | Ala | Pro | Lys | Phe | Leu | Ile |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Tyr | Tyr | Ala | Asn | Ser | Leu | Gln | Thr | Gly | Val | Pro | Ser | Arg | Phe | Ser | Gly |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Gly | Ser | Gly | Thr | Asp | Phe | Thr | Leu | Thr | Ile | Ser | Ser | Leu | Gln | Pro |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |

# MD 4733 C1 2021.07.31

132

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Gly Trp Thr  
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 52

<211> 106

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Lanț poliptidic al anticorpului umanizat

<400> 52

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Ile His Lys Asn  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Tyr Ala Asn Ser Leu Gln Thr Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Gly Trp Thr  
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 53

<211> 19

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Secvență lider de peptida cu Lanț greu

<400> 53

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly  
1 5 10 15

Val His Ser

<210> 54

<211> 20

# MD 4733 C1 2021.07.31

133

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Secvență lider de peptida cu Lanț ușor

<400> 54

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Ser | Val | Pro | Thr | Gln | Val | Leu | Gly | Leu | Leu | Leu | Leu | Trp | Leu | Thr |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     | 15  |     |

|     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Ala | Arg | Cys |
|     |     |     | 20  |

<210> 55

<211> 325

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Domeniu constant de Lanț greu - polipeptida IgG4 S228P

<400> 55

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Pro | Leu | Ala | Pro | Cys | Ser | Arg | Ser | Thr |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     | 15  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Glu | Ser | Thr | Ala | Ala | Leu | Gly | Cys | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     |     | 30  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp | Asn | Ser | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Lys | Thr | Tyr | Thr |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Cys | Asn | Val | Asp | His | Lys | Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Arg | Val |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Ser | Lys | Tyr | Gly | Pro | Pro | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Phe |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Gln | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Gln | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     | 160 |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Phe | Asn | Ser |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|

# MD 4733 C1 2021.07.31

134

165

170

175

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
180 185 190

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser  
195 200 205

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
210 215 220

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln  
225 230 235 240

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
245 250 255

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
260 265 270

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu  
275 280 285

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
290 295 300

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
305 310 315 320

Leu Ser Leu Gly Lys  
325

<210> 56

<211> 105

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Domeniu constant al lanțului ușor Kappa al polipeptidei

<400> 56

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu  
1 5 10 15

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro  
20 25 30

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly  
35 40 45

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr  
50 55 60

# MD 4733 C1 2021.07.31

135

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His  
65 70 75 80

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val  
85 90 95

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
100 105

<210> 57  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secvență artificială

<220>  
<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 57  
Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp Tyr Ala Trp Asn  
1 5 10

<210> 58  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Secvență artificială

<220>  
<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 58  
Tyr Ile Ser Asn Ser Gly Ser Ala Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
1 5 10 15

<210> 59  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Secvență artificială

<220>  
<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 59  
Leu Ile Tyr Tyr Asp Tyr Gly Gly Ala Met Asn Phe  
1 5 10

<210> 60  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Secvență artificială

<220>  
<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 60  
Lys Ala Ser Gln Gly Val Ser Thr Thr Val Ala

# MD 4733 C1 2021.07.31

136

1

5

10

<210> 61

<211> 7

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 61

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr

1

5

<210> 62

<211> 9

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 62

Gln His Tyr Tyr Ser Thr Pro Trp Thr

1

5

<210> 63

<211> 121

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 63

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln

1

5

10

15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp

20

25

30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp

35

40

45

Met Gly Tyr Ile Ser Asn Ser Gly Ser Ala Ser Tyr Asn Pro Ser Leu

50

55

60

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe

65

70

75

80

Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Thr Leu Ile Tyr Tyr Asp Tyr Gly Gly Ala Met Asn Phe Trp Gly

100

105

110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115

120

# MD 4733 C1 2021.07.31

137

<210> 64  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 64  
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Gly Val Ser Thr Thr  
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ser  
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Tyr Ser Thr Pro Trp  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 65  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secvență artificială

<220>  
<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 65  
Tyr Ala Ser Asn Leu Gln Thr  
1 5

<210> 66  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secvență artificială

<220>  
<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 66  
Tyr Ala Ser Ser Leu Gln Thr  
1 5

<210> 67  
<211> 7  
<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 67

Tyr Ala Ser Thr Leu Gln Thr  
1 5

<210> 68

<211> 7

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 68

Tyr Ala Thr Thr Leu Gln Thr  
1 5

<210> 69

<211> 7

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 69

Tyr Ala Ser Tyr Leu Gln Thr  
1 5

<210> 70

<211> 7

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 70

Tyr Ala Asn Gln Leu Gln Thr  
1 5

<210> 71

<211> 7

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 71

Tyr Ala Gly Ser Leu Gln Thr  
1 5

<210> 72  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secvență artificială

<220>  
<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 72  
Tyr Ala Ser Gln Leu Gln Thr  
1 5

<210> 73  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secvență artificială

<220>  
<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 73  
Tyr Ala Asp Ser Leu Gln Thr  
1 5

<210> 74  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Secvență artificială

<220>  
<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 74  
Gln Gln Tyr Tyr Ser Gly Phe Thr  
1 5

<210> 75  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Secvență artificială

<220>  
<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 75  
Gln Gln Tyr Tyr Ser Gly Tyr Thr  
1 5

<210> 76  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Secvență artificială

<220>  
<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 76  
Gln Gln Tyr Tyr Ser Gly Ile Thr

# MD 4733 C1 2021.07.31

140

1

5

<210> 77

<211> 8

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 77

Gln Gln Tyr Tyr Ser Gly Val Thr

1

5

<210> 78

<211> 8

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 78

Gln Gln Tyr Tyr Ser Gly Leu Thr

1

5

<210> 79

<211> 19

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 79

Met Pro Ser Phe Ile Thr Leu Ala Ser Leu Ser Thr Phe Glu Gly Tyr

1

5

10

15

Phe Asp Phe

<210> 80

<211> 19

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 80

Met Pro Ser Phe Ile Thr Leu Ala Ser Leu Ser Thr Tyr Glu Gly Tyr

1

5

10

15

Phe Asp Phe

# MD 4733 C1 2021.07.31

141

<210> 81  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Secvență artificială

<220>  
<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 81  
Met Pro Ser Phe Ile Thr Leu Ala Ser Leu Ser Thr Ile Glu Gly Tyr  
1 5 10 15

Phe Asp Phe

<210> 82  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Secvență artificială

<220>  
<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 82  
Met Pro Ser Phe Ile Thr Leu Ala Ser Leu Ser Thr Val Glu Gly Tyr  
1 5 10 15

Phe Asp Phe

<210> 83  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Secvență artificială

<220>  
<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 83  
Met Pro Ser Phe Ile Thr Leu Ala Ser Leu Ser Thr Leu Glu Gly Tyr  
1 5 10 15

Phe Asp Phe

<210> 84  
<211> 363  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<400> 84  
gatgtgcagc ttcaggagtc gggacctggc ctggtgaaac cttctcagtc tctgtccctc  
60

acctgcactg tcactggcta ctcaatcacc agtgattatg cctggaactg gatccgacag  
120

# MD 4733 C1 2021.07.31

142

tttccaggaa acaaactgga gtggatgggc tacataagca acagtggtag cgctagctac  
180

aacctatctc tcaaaagtcg catctctatc actcgagaca catccaagaa ccagttcttc  
240

ctgcagttga attctgtgac tactgaggac acagccacat attactgtgc aaccctgac  
300

tactatgatt acgggggggc tatgaacttc tgggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc  
360

tca  
363

<210> 85  
<211> 321  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<400> 85  
gacattgtga tgaccagtc tcacaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc  
60

atcacctgca aggccagtc ggggtgtgagt actactgtgg cctgggtatca acagaaacca  
120

ggacaatctc ctaaactact gatttactcg gcatcctacc ggtacactgg agtccctgat  
180

cgcttcactg gcagtggatc tgggacggat ttcactttca ccatcagcag tgtgcagttc  
240

gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcat tattatagta ctccgtggac gttcgggtgga  
300

ggcaccaagc tggaaatcaa a  
321

<210> 86  
<211> 330  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 86  
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
65 70 75 80

## MD 4733 C1 2021.07.31

143

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
130 135 140

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Lys | Phe | Asn | Trp |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
325 330

|       |     |
|-------|-----|
| <210> | 87  |
| <211> | 133 |
| <212> | PRT |

# MD 4733 C1 2021.07.31

144

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Popipeptida proteinei de fuziune

<400> 87

Gly Thr Ile Glu Thr Thr Gly Asn Ile Ser Ala Glu Lys Gly Gly Ser  
1 5 10 15

Ile Ile Leu Gln Cys His Leu Ser Ser Thr Thr Ala Gln Val Thr Gln  
20 25 30

Val Asn Trp Glu Gln Gln Asp Gln Leu Leu Ala Ile Cys Asn Ala Asp  
35 40 45

Leu Gly Trp His Ile Ser Pro Ser Phe Lys Asp Arg Val Ala Pro Gly  
50 55 60

Pro Gly Leu Gly Leu Thr Leu Gln Ser Leu Thr Val Asn Asp Thr Gly  
65 70 75 80

Glu Tyr Phe Cys Ile Tyr His Thr Tyr Pro Asp Gly Thr Tyr Thr Gly  
85 90 95

Arg Ile Phe Leu Glu Val Leu Glu Ser Ser Val Ala Glu His Gly Ala  
100 105 110

Arg Phe Gln Ile Pro Leu Leu Gly Ala His His His His His His His  
115 120 125

His His Gly Gly Gln  
130

<210> 88

<211> 5

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 88

Ser Tyr Val Met His  
1 5

<210> 89

<211> 17

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 89

Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Asp Gly Ala Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

# MD 4733 C1 2021.07.31

145

1 5 10 15

Gly

<210> 90

<211> 10

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 90

Gly Gly Pro Tyr Gly Trp Tyr Phe Asp Val  
1 5 10

<210> 91

<211> 11

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 91

Arg Ala Ser Glu His Ile Tyr Ser Tyr Leu Ser  
1 5 10

<210> 92

<211> 7

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 92

Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu  
1 5

<210> 93

<211> 9

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 93

Gln His His Phe Gly Ser Pro Leu Thr  
1 5

<210> 94

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

# MD 4733 C1 2021.07.31

146

<400> 94

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ser  
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Asp Gly Ala Lys Tyr Asn Glu Lys Phe  
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Pro Tyr Gly Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly  
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 95

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 95

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu His Ile Tyr Ser Tyr  
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val  
35 40 45

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Phe Gly Ser Pro Leu  
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Thr Leu Glu Leu Lys  
100 105

# MD 4733 C1 2021.07.31

147

<210> 96  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Secvență artificială

<220>  
<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 96  
Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Arg Gly Ala Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Gly  
1 5 10 15

<210> 97  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Secvență artificială

<220>  
<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 97  
Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Leu Gly Ala Lys Tyr Asn Glu Lys Gly Phe  
1 5 10 15

<210> 98  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Secvență artificială

<220>  
<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 98  
Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Lys Gly Ala Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Gly  
1 5 10 15

<210> 99  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Secvență artificială

<220>  
<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 99  
Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Phe Gly Ala Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Gly  
1 5 10 15

<210> 100  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Secvență artificială

<220>  
<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 100

# MD 4733 C1 2021.07.31

148

Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Ser Gly Ala Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Gly  
1 5 10 15

<210> 101

<211> 16

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 101

Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Tyr Gly Ala Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Gly  
1 5 10 15

<210> 102

<211> 16

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 102

Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Val Gly Ala Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Gly  
1 5 10 15

<210> 103

<211> 17

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 103

Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Asp Arg Ala Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 104

<211> 17

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 104

Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Asp Asn Ala Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 105

<211> 17

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 105

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Tyr | Ile | Asp | Pro | Tyr | Asn | Asp | Gln | Ala | Lys | Tyr | Asn | Glu | Lys | Phe | Lys |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

Gly

<210> 106

<211> 17

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 106

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Tyr | Ile | Asp | Pro | Tyr | Asn | Asp | Glu | Ala | Lys | Tyr | Asn | Glu | Lys | Phe | Lys |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

Gly

<210> 107

<211> 17

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 107

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Tyr | Ile | Asp | Pro | Tyr | Asn | Asp | Leu | Ala | Lys | Tyr | Asn | Glu | Lys | Phe | Lys |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

Gly

<210> 108

<211> 17

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 108

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Tyr | Ile | Asp | Pro | Tyr | Asn | Asp | Lys | Ala | Lys | Tyr | Asn | Glu | Lys | Phe | Lys |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

# MD 4733 C1 2021.07.31

150

Gly

<210> 109

<211> 17

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 109

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Tyr | Ile | Asp | Pro | Tyr | Asn | Asp | Ser | Ala | Lys | Tyr | Asn | Glu | Lys | Phe | Lys |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

Gly

<210> 110

<211> 17

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 110

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Tyr | Ile | Asp | Pro | Tyr | Asn | Asp | Tyr | Ala | Lys | Tyr | Asn | Glu | Lys | Phe | Lys |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

Gly

<210> 111

<211> 17

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 111

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Tyr | Ile | Asp | Pro | Tyr | Asn | Asp | Val | Ala | Lys | Tyr | Asn | Glu | Lys | Phe | Lys |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

Gly

<210> 112

<211> 7

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 112  
Ala Ala Lys Thr Leu Ala Glu  
1 5

<210> 113  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secvență artificială

<220>  
<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 113  
Tyr Ala Lys Thr Leu Ala Glu  
1 5

<210> 114  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secvență artificială

<220>  
<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 114  
Trp Ala Lys Thr Leu Ala Glu  
1 5

<210> 115  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secvență artificială

<220>  
<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 115  
Ser Ala Lys Thr Leu Ala Glu  
1 5

<210> 116  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secvență artificială

<220>  
<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 116  
Thr Ala Lys Thr Leu Ala Glu  
1 5

<210> 117  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 117

Ile Ala Lys Thr Leu Ala Glu  
1 5

<210> 118

<211> 7

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 118

Val Ala Lys Thr Leu Ala Glu  
1 5

<210> 119

<211> 7

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 119

Asn Asn Lys Thr Leu Ala Glu  
1 5

<210> 120

<211> 7

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 120

Asn Ile Lys Thr Leu Ala Glu  
1 5

<210> 121

<211> 7

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 121

Asn Leu Leu Thr Leu Ala Glu  
1 5

<210> 122

# MD 4733 C1 2021.07.31

153

<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secvență artificială

<220>  
<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 122  
Asn Thr Lys Thr Leu Ala Glu  
1 5

<210> 123  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secvență artificială

<220>  
<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 123  
Asn Val Lys Thr Leu Ala Glu  
1 5

<210> 124  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> Secvență artificială

<220>  
<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Lanț polipeptidic al anticorpului umanizat

<400> 124  
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Asp Gly Ala Lys Tyr Ser Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Pro Tyr Gly Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115

# MD 4733 C1 2021.07.31

154

<210> 125

<211> 119

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Lanț polipeptidic al anticorpului umanizat

<400> 125

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Asp Gly Ala Lys Tyr Ser Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Pro Tyr Gly Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 126

<211> 119

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Lanț polipeptidic al anticorpului umanizat

<400> 126

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Asp Gly Ala Lys Tyr Ala Gln Lys Phe

## MD 4733 C1 2021.07.31

155

[illegible]

```
<210> 127
<211> 119
<212> PRT
<213> Secvență artificială
```

<220>  
<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Lanț polipeptidic al anticorpului umanizat

<400> 127  
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1                  5                  10                  15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Val | Met | His | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Gln | Gly | Leu | Glu | Trp | Ile |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |

Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Asp Gly Ala Lys Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Thr Ser Thr Val Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Pro Tyr Gly Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115

```
<210> 128
<211> 119
<212> PRT
<213> Secvență artificială
```

<220>

# MD 4733 C1 2021.07.31

156

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Lanț polipeptidic al anticorpului umanizat

<400> 128

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Asp Gly Ala Lys Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Pro Tyr Gly Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 129

<211> 119

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Lanț polipeptidic al anticorpului umanizat

<400> 129

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Asp Gly Ala Lys Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Val Val Tyr Tyr Cys

# MD 4733 C1 2021.07.31

157

85

90

95

Ala Arg Gly Gly Pro Tyr Gly Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 130

<211> 107

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Lanț polipeptidic al anticorpului umanizat

<400> 130

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu His Ile Tyr Ser Tyr  
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Phe Gly Ser Pro Leu  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 131

<211> 107

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Lanț polipeptidic al anticorpului umanizat

<400> 131

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu His Ile Tyr Ser Tyr  
20 25 30

# MD 4733 C1 2021.07.31

158

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Phe Gly Ser Pro Leu  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 132

<211> 107

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Lanț polipeptidic al anticorpului umanizat

<400> 132

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu His Ile Tyr Ser Tyr  
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Phe Gly Ser Pro Leu  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 133

<211> 107

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Lanț polipeptidic al anticorpului umanizat

# MD 4733 C1 2021.07.31

159

<400> 133

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu His Ile Tyr Ser Tyr  
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Phe Gly Ser Pro Leu  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 134

<211> 17

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 134

Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Asp Gly Ala Lys Tyr Ala Gln Lys Phe Gln  
1 5 10 15

Gly

<210> 135

<211> 17

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 135

Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Asp Gly Ala Lys Tyr Ser Gln Lys Phe Gln  
1 5 10 15

Gly

<210> 136

<211> 116

# MD 4733 C1 2021.07.31

160

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Secvență VH a polipeptidei

<400> 136

Gln Val Gln Leu Met Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Pro Leu Thr Ser Tyr  
20 25 30

Thr Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Ala Ile Trp Ser Ser Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Leu Asn Ile Asn Arg Asp Ser Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu  
65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Phe Cys Thr  
85 90 95

Lys Ser Gly Trp Ala Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Val Met Val  
100 105 110

Thr Val Ser Ser  
115

<210> 137

<211> 106

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Secvență VL a polipeptidei

<400> 137

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Leu Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Leu Asn Cys Ile Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Lys Ser  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Leu Lys Leu Gly Glu Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Asn Ala Asn Ser Leu Gln Ala Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ala Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Pro

## MD 4733 C1 2021.07.31

161

65                      70                      75                      80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Gly Gly Tyr Thr  
                      85                      90                      95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
100 105

```
<210> 138
<211> 119
<212> PRT
<213> Secvență artificială
```

<220>  
<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Secvență VH a polipeptidei

<400> 138  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Arg  
1                  5                  10                  15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr  
20 25 30

Tyr Met Ala Trp Val Arg Leu Ala Pro Gln Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Ser Ile Ser Tyr Glu Gly Ser Arg Thr His Tyr Gly Asp Ser Val  
50 55 60

Arg Gly Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Pro Lys Asn Ile Leu Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Gly Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys  
85 90 95

Ala Arg His Thr Gly Thr Leu Asp Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Ile Val Ser Ser  
115

```
<210> 139
<211> 106
<212> PRT
<213> Secvență artificială
```

<220>  
<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
Secvență VL a polipeptidei

```
<400> 139
Asn Ile Val Met Ala Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Ile Ser Ala Gly
1             5             10            15
```

# MD 4733 C1 2021.07.31

162

Asp Arg Val Thr Met Asn Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Asp Asn Asn  
20 25 30

Ile Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Phe Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
50 55 60

Gly Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Lys Ser Val Gln Ala  
65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Phe Tyr Tyr Cys Gln Arg Ile Tyr Asn Phe Pro Thr  
85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 140  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Secvență artificială

<220>  
<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (13)..(13)  
<223> Trp, Phe, Tyr, Ile, Val sau Leu

<400> 140  
Met Pro Ser Phe Ile Thr Leu Ala Ser Leu Ser Thr Xaa Glu Gly Tyr  
1 5 10 15

Phe Asp Phe

<210> 141  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secvență artificială

<220>  
<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (3)..(3)  
<223> Asn, Ser, Thr, Gly sau Asp

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (4)..(4)  
<223> Ser, Asn, Ser, Thr, Tyr sau Gln

<400> 141  
Tyr Ala Xaa Xaa Leu Gln Thr  
1 5

<210> 142  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Secvență artificială

<220>  
<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (7)..(7)  
<223> Trp, Phe, Tyr, Ile, Val sau Leu

<400> 142  
Gln Gln Tyr Tyr Ser Gly Xaa Thr  
1 5

<210> 143  
<211> 127  
<212> PRT  
<213> Secvență artificială

<220>  
<223> Descrierea secvenței artificiale: polipeptida de consens sintetică

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (6)..(6)  
<223> Glu sau Gln

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (9)..(9)  
<223> Pro sau Ala

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (12)..(12)  
<223> Val sau Leu

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (15)..(15)  
<223> Ser sau Pro

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (16)..(16)  
<223> Gln, Glu sau Gly

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (17)..(17)  
<223> Ser sau Thr

<220>

<221> MOD\_RES  
<222> (23)..(23)  
<223> Ser, Thr sau Ala

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (25)..(25)  
<223> Thr sau Ser

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (27)..(27)  
<223> Ile sau Val

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (30)..(30)  
<223> Lys sau Gln

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (37)..(37)  
<223> Pro sau Phe

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (39)..(39)  
<223> Asn sau Lys

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (40)..(40)  
<223> Lys sau Gly

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (43)..(43)  
<223> Met sau Leu

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (44)..(44)  
<223> Met sau Ile

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (45)..(45)  
<223> Ile sau Val

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (48)..(48)  
<223> Ser sau Thr

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (67)..(67)  
<223> Thr sau Ser

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (68)..(68)  
<223> Arg sau Val

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (70)..(70)

<223> Phe sau Ser

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (71)..(71)

<223> Gln sau Lys

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (79)..(79)

<223> His sau Ser

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (81)..(81)

<223> Thr sau Ala

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (83)..(83)

<223> Asp sau Ala

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (87)..(87)

<223> Thr sau Val

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (88)..(88)

<223> Ser sau Tyr

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (92)..(92)

<223> Trp, Phe, Tyr, Ile sau Val

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (94)..(94)

<223> Met, Val, Leu, Ala, Arg, Asn, Pro, Gln, Glu, Gly, Ile  
His, Lys, Phe, Ser, Thr, Trp sau Tyr

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (110)..(110)

<223> Val, Thr sau Leu

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (119)..(119)

<223> Ser, Gly sau Tyr

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (122)..(122)

<223> Ala sau Ser

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (123)..(123)

<223> Pro sau Gln

<400> 143

Glu Val Gln Leu Gln Xaa Ser Gly Xaa Gly Leu Xaa Lys Pro Xaa Xaa

1

5

10

15

# MD 4733 C1 2021.07.31

166

Xaa Leu Ser Leu Thr Cys Xaa Val Xaa Gly Xaa Ser Ile Xaa Ser Asp  
20 25 30

Tyr Trp Gly Trp Xaa Arg Xaa Xaa Pro Gly Xaa Xaa Xaa Glu Trp Xaa  
35 40 45

Gly Phe Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Xaa Xaa Ile Xaa Xaa Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Xaa Leu  
65 70 75 80

Xaa Leu Xaa Ser Val Thr Xaa Xaa Asp Thr Ala Xaa Tyr Xaa Cys Ala  
85 90 95

Arg Met Pro Ser Phe Ile Thr Leu Ala Ser Leu Ser Thr Xaa Glu Gly  
100 105 110

Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Xaa Gly Thr Xaa Xaa Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 144

<211> 127

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: polipeptida de consens sintetică

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (6)..(6)

<223> Glu sau Gln

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (9)..(9)

<223> Pro sau Ala

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (12)..(12)

<223> Val sau Leu

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (15)..(15)

<223> Ser sau Pro

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (16)..(16)

<223> Glu sau Gly

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (23)..(23)

<223> Thr, Ala sau Ser

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (25)..(25)

<223> Ser sau Thr

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (27)..(27)

<223> Gly, Ser sau Tyr

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (30)..(30)

<223> Ser sau Ala

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (37)..(37)

<223> Ile sau Val

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (39)..(39)

<223> Gln sau Lys

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (40)..(40)

<223> Pro sau Phe

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (44)..(44)

<223> Gly sau Lys

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (45)..(45)

<223> Leu sau Met

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (48)..(48)

<223> Ile sau Met

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (67)..(67)

<223> Val sau Ile

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (71)..(71)

<223> Val sau Arg

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (83)..(83)

<223> Ser sau His

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (88)..(88)

<223> Ala sau Asp

# MD 4733 C1 2021.07.31

168

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (110)..(110)  
<223> Trp, Phe, Tyr, Ile, Val sau Leu

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (122)..(122)  
<223> Met, Val, Leu, Ala, Arg, Asn, Pro, Gln, Glu, Gly, Ile, His,  
Lys, Phe, Ser, Thr, Trp sau Tyr

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (123)..(123)  
<223> Val, Thr sau Leu

<400> 144  
Glu Val Gln Leu Gln Xaa Ser Gly Xaa Gly Leu Xaa Lys Pro Xaa Xaa  
1 5 10 15  
  
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Xaa Val Xaa Gly Xaa Ser Ile Xaa Ser Asp  
20 25 30  
  
Tyr Trp Gly Trp Xaa Arg Xaa Xaa Pro Gly Lys Xaa Xaa Glu Trp Xaa  
35 40 45  
  
Gly Phe Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
50 55 60  
  
Ser Arg Xaa Thr Ile Ser Xaa Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
65 70 75 80  
  
Lys Leu Xaa Ser Val Thr Ala Xaa Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95  
  
Arg Met Pro Ser Phe Ile Thr Leu Ala Ser Leu Ser Thr Xaa Glu Gly  
100 105 110  
  
Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Xaa Xaa Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 145  
<211> 106  
<212> PRT  
<213> Secvență artificială

<220>  
<223> Descrierea secvenței artificiale: polipeptida de consens sintetică

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (10)..(10)  
<223> Leu sau Ser

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (21)..(21)

<223> Leu sau Ile

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (22)..(22)  
<223> Asn sau Thr

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (40)..(40)  
<223> Leu sau Pro

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (42)..(42)  
<223> Glu sau Lys

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (43)..(43)  
<223> Phe sau Leu

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (46)..(46)  
<223> Asn, Ser, Thr, Gly sau Asp

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (52)..(52)  
<223> Ser, Asn, Thr, Tyr sau Gln

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (53)..(53)  
<223> Ile sau Val

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (58)..(58)  
<223> Gly sau Ser

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (77)..(77)  
<223> Val sau Phe

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (83)..(83)  
<223> Phe sau Tyr

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (87)..(87)  
<223> Trp, Phe, Tyr, Ile, Val sau Leu

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (95)..(95)  
<223> Leu sau Ile

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (105)..(105)  
<223> Ala sau Val

# MD 4733 C1 2021.07.31

170

<400> 145

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Ile | Gln | Met | Thr | Gln | Ser | Pro | Ser | Xaa | Leu | Ser | Ala | Ser | Val | Gly |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Arg | Val | Thr | Xaa | Xaa | Cys | Lys | Ala | Ser | Gln | Ser | Ile | His | Lys | Asn |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Ala | Trp | Tyr | Gln | Gln | Lys | Xaa | Gly | Xaa | Xaa | Pro | Lys | Xaa | Leu | Ile |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Tyr | Tyr | Ala | Xaa | Xaa | Leu | Gln | Thr | Gly | Xaa | Pro | Ser | Arg | Phe | Ser | Gly |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Gly | Ser | Gly | Thr | Asp | Phe | Thr | Leu | Thr | Ile | Ser | Xaa | Leu | Gln | Pro |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Asp | Xaa | Ala | Thr | Tyr | Xaa | Cys | Gln | Gln | Tyr | Tyr | Ser | Gly | Xaa | Thr |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Phe | Gly | Gly | Gly | Thr | Lys | Val | Glu | Xaa | Lys |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     |     | 105 |

<210> 146

<211> 106

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: polipeptida de consens sintetică

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (43)..(43)

<223> Leu sau Phe

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (46)..(46)

<223> Asn, Ser, Thr, Gly sau Asp

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (52)..(52)

<223> Ser, Asn, Thr, Tyr sau Gln

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (53)..(53)

<223> Val sau Ile

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (58)..(58)

<223> Trp, Phe, Tyr, Ile, Val sau Leu

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (83)..(83)

<223> Ala sau Val

# MD 4733 C1 2021.07.31

171

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (95)..(95)

<223> Phe sau Val

<400> 146

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Ile His Lys Asn  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Xaa Pro Lys Xaa Leu Ile  
35 40 45

Tyr Tyr Ala Xaa Xaa Leu Gln Thr Gly Xaa Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Xaa Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Gly Xaa Thr  
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105

<210> 147

<211> 17

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: polipeptida de consens sintetică

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (7)..(7)

<223> Asp, Arg, Leu, Lys, Phe, Ser, Tyr sau Val

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (8)..(8)

<223> Gly, Arg, Asn, Gln, Glu, Leu, Lys, Ser, Tyr sau Val

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (12)..(12)

<223> Asn, Ala sau Ser

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)..(13)

<223> Glu sau Gln

<220>

<221> MOD\_RES

# MD 4733 C1 2021.07.31

172

<222> (16)..(16)  
<223> Lys sau Gln

<400> 147  
Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Xaa Xaa Ala Lys Tyr Xaa Xaa Lys Phe Xaa  
1 5 10 15

Gly

<210> 148  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secvență artificială

<220>  
<223> Descrierea secvenței artificiale: polipeptida de consens sintetică

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> Asn, Ala, Val, Trp, Ser, Thr, Arg, His, Gly,  
Ile sau Val

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (2)..(2)  
<223> Ala, Asn, Ile, Leu, Thr sau Val

<400> 148  
Xaa Xaa Lys Thr Leu Ala Glu  
1 5

<210> 149  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> Secvență artificială

<220>  
<223> Descrierea secvenței artificiale: polipeptida de consens sintetică

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (5)..(5)  
<223> Gln sau Val

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (9)..(9)  
<223> Pro sau Ala

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (11)..(11)  
<223> Val sau Leu

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (12)..(12)  
<223> Val sau Lys

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (16)..(16)  
<223> Ser sau Ala

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (20)..(20)  
<223> Met sau Val

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (38)..(38)  
<223> Lys sau Arg

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (40)..(40)  
<223> Lys sau Ala

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (44)..(44)  
<223> Gly sau Arg

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (56)..(56)  
<223> Asp, Arg, Leu, Lys, Phe, Ser, Tyr sau Val

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (57)..(57)  
<223> Gly, Arg, Asn, Gln, Glu, Leu, Lys, Ser, Tyr sau Val

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (61)..(61)  
<223> Asn, Ala sau Ser

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (62)..(62)  
<223> Glu sau Gln

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (65)..(65)  
<223> Lys sau Gln

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (67)..(67)  
<223> Arg sau Lys

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (68)..(68)  
<223> Ala sau Val

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (72)..(72)  
<223> Ser sau Arg

<220>

# MD 4733 C1 2021.07.31

174

<221> MOD\_RES  
<222> (74)..(74)  
<223> Lys sau Thr

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (76)..(76)  
<223> Ser, Ile, Ala sau Thr

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (79)..(79)  
<223> Ala sau Val

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (85)..(85)  
<223> Arg sau Ser

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (87)..(87)  
<223> Thr sau Arg

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (89)..(89)  
<223> Asp sau Glu

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (91)..(91)  
<223> Ser sau Thr

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (92)..(92)  
<223> Ala sau Val

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (104)..(104)  
<223> Trp, Ala, Asp, Gly, Phe, Gly, Ile, Lys, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr  
Val sau Tyr

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (111)..(111)  
<223> Ala sau Gln

<400> 149  
Glu Val Gln Leu Xaa Gln Ser Gly Xaa Glu Xaa Xaa Lys Pro Gly Xaa  
1 5 10 15

Ser Val Lys Xaa Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Val Met His Trp Val Xaa Gln Xaa Pro Gly Gln Xaa Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Xaa Xaa Ala Lys Tyr Xaa Xaa Lys Phe  
50 55 60

# MD 4733 C1 2021.07.31

175

Xaa Gly Xaa Xaa Thr Leu Thr Xaa Asp Xaa Ser Xaa Ser Thr Xaa Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Xaa Leu Xaa Ser Xaa Asp Xaa Xaa Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Pro Tyr Gly Xaa Tyr Phe Asp Val Trp Gly Xaa Gly  
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 150

<211> 119

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: polipeptida de consens sintetică

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (16)..(16)

<223> Ala sau Ser

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (44)..(44)

<223> Arg sau Gly

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (56)..(56)

<223> Asp, Arg, Leu, Lys, Phe, Ser, Tyr sau Val

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (57)..(57)

<223> Gly, Arg, Asn, Gln, Glu, Leu, Lys, Ser, Tyr sau Val

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (61)..(61)

<223> Asn, Ala sau Ser

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (62)..(62)

<223> Glu sau Gln

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (65)..(65)

<223> Lys sau Gln

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (72)..(72)

<223> Arg sau Ser

<220>

# MD 4733 C1 2021.07.31

176

<221> MOD\_RES  
<222> (74)..(74)  
<223> Thr sau Lys

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (76)..(76)  
<223> Ala, Thr sau Ile

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (79)..(79)  
<223> Arg sau Val

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (85)..(85)  
<223> Ser sau Arg

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (89)..(89)  
<223> Glu sau Asp

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (92)..(92)  
<223> Ala sau Val

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (104)..(104)  
<223> Trp, Ala, Asp, Gly, Phe, Gly, Ile, Lys, Asn, Ser,  
Thr, Val sau Tyr

<400> 150  
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Xaa  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr  
20 25 30

Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Xaa Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Xaa Xaa Ala Lys Tyr Xaa Xaa Lys Phe  
50 55 60

Xaa Gly Arg Val Thr Leu Thr Xaa Asp Xaa Ser Xaa Ser Thr Xaa Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Xaa Leu Arg Ser Xaa Asp Thr Xaa Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Pro Tyr Gly Xaa Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 151  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Secvență artificială

<220>  
<223> Descrierea secvenței artificiale: polipeptida de consens sintetică

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (9)..(9)  
<223> Ala sau Ser

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (17)..(17)  
<223> Glu sau Asp

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (18)..(18)  
<223> Thr sau Arg

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (40)..(40)  
<223> Gln sau Pro

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (43)..(43)  
<223> Ser, Ala sau Val

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (45)..(45)  
<223> Gln sau Lys

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (48)..(48)  
<223> Val sau Ile

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (50)..(50)  
<223> Asn, Ala, Tyr, Trp, Ser, Thr, Ile sau Val

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (51)..(51)  
<223> Ala, Asn, Ile, Leu, Thr sau Val

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (70)..(70)  
<223> Gln sau Asp

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (72)..(72)  
<223> Ser sau Thr

<220>

# MD 4733 C1 2021.07.31

178

<221> MOD\_RES  
<222> (74)..(74)  
<223> Lys sau Thr

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (76)..(76)  
<223> Asn sau Ser

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (83)..(83)  
<223> Phe sau Val

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (84)..(84)  
<223> Gly sau Ala

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (100)..(100)  
<223> Ala sau Gln

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (103)..(103)  
<223> Thr sau Arg

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (106)..(106)  
<223> Leu sau Ile

<400> 151  
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Xaa Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Xaa Xaa Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu His Ile Tyr Ser Tyr  
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Xaa Gly Lys Xaa Pro Xaa Leu Leu Xaa  
35 40 45

Tyr Xaa Xaa Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Xaa Phe Xaa Leu Xaa Ile Xaa Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Xaa Xaa Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Phe Gly Ser Pro Leu  
85 90 95

Thr Phe Gly Xaa Gly Thr Xaa Leu Glu Xaa Lys  
100 105

<210> 152  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Secvență artificială

# MD 4733 C1 2021.07.31

179

<220>  
<223> Descrierea secvenței artificiale: polipeptida de consens sintetică

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (43)..(43)  
<223> Ala sau Val

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (50)..(50)  
<223> Asn, Ala, Tyr, Trp, Ser, Thr, Ile sau Val

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (51)..(51)  
<223> Ala, Asn, Ile, Leu, Thr sau Val

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (70)..(70)  
<223> Asp sau Gln

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (83)..(83)  
<223> Phe sau Val

<400> 152  
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu His Ile Tyr Ser Tyr  
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Xaa Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Xaa Xaa Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Xaa Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Xaa Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Phe Gly Ser Pro Leu  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 153  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secvență artificială

<220>  
<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (6)..(6)  
<223> Trp, Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, Ile, Lys, Asn, Gln,  
Arg, Ser, Thr, Val sau Tyr

<400> 153  
Gly Gly Pro Tyr Gly Xaa Tyr Phe Asp Val  
1 5 10

<210> 154  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secvență artificială

<220>  
<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică  
CDR peptide

<400> 154  
Gly Gly Pro Tyr Gly Ala Tyr Phe Asp Val  
1 5 10

<210> 155  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secvență artificială

<220>  
<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 155  
Gly Gly Pro Tyr Gly Asp Tyr Phe Asp Val  
1 5 10

<210> 156  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secvență artificială

<220>  
<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 156  
Gly Gly Pro Tyr Gly Glu Tyr Phe Asp Val  
1 5 10

<210> 157  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Secvență artificială

<220>  
<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 157  
Gly Gly Pro Tyr Gly Phe Tyr Phe Asp Val

# MD 4733 C1 2021.07.31

181

1

5

10

<210> 158

<211> 10

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 158

Gly Gly Pro Tyr Gly Gly Tyr Phe Asp Val

1

5

10

<210> 159

<211> 10

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 159

Gly Gly Pro Tyr Gly Ile Tyr Phe Asp Val

1

5

10

<210> 160

<211> 10

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 160

Gly Gly Pro Tyr Gly Lys Tyr Phe Asp Val

1

5

10

<210> 161

<211> 10

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 161

Gly Gly Pro Tyr Gly Asn Tyr Phe Asp Val

1

5

10

<210> 162

<211> 10

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 162

Gly Gly Pro Tyr Gly Gln Tyr Phe Asp Val  
1 5 10

<210> 163

<211> 10

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 163

Gly Gly Pro Tyr Gly Arg Tyr Phe Asp Val  
1 5 10

<210> 164

<211> 10

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 164

Gly Gly Pro Tyr Gly Ser Tyr Phe Asp Val  
1 5 10

<210> 165

<211> 10

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 165

Gly Gly Pro Tyr Gly Thr Tyr Phe Asp Val  
1 5 10

<210> 166

<211> 10

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 166

Gly Gly Pro Tyr Gly Val Tyr Phe Asp Val  
1 5 10

<210> 167

<211> 10

<212> PRT

<213> Secvență artificială

# MD 4733 C1 2021.07.31

183

<220>

<223> Descrierea secvenței artificiale: peptida CDR sintetică

<400> 167

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Gly | Pro | Tyr | Gly | Tyr | Tyr | Phe | Asp | Val |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |

**(56) Referințe bibliografice citate în descriere:**

1. Pluckthun. The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore edit. Springer-Verlag. New York, 1994, p. 269-315
2. Muyldermans et al. Trends Biochem. Sci. no 26, 2001, p. 230
3. EP 0404097 A2 1990.12.27
4. Kohler et al. Nature, no 256, 1975, p. 495
5. US 4816567 A 1989.03.28

**(57) Revendicări:**

1. Anticorp sau fragment al acestuia de legare a antigenului care se leagă la TIGIT uman, în care anticorpul sau fragmentul de legare a antigenului conține o regiune variabilă a lanțului greu și o regiune variabilă a lanțului ușor, în care regiunea variabilă a lanțului greu conține CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența aminoacidă a SECV. ID NR: 88, CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența aminoacidă a SECV. ID NR: 89 sau 134 și CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența aminoacidă a SECV. ID NR: 90, și în care regiunea variabilă a lanțului ușor conține CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența aminoacidă a SECV. ID NR: 91, CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența aminoacidă a SECV. ID NR: 92 și CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența aminoacidă a SECV. ID NR: 93.

2. Anticorp sau fragment de legare a antigenului, conform revendicării 1, în care anticorpul conține CDR1 a regiunii variabile a lanțului greu conținând secvența aminoacidă a SECV. ID NR: 88, CDR2 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența aminoacidă a SECV. ID NR: 134 și CDR3 a regiunii variabile a lanțului greu cuprinzând secvența aminoacidă a SECV. ID NR: 90, și în care regiunea variabilă a lanțului ușor conține CDR1 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența aminoacidă a SECV. ID NR: 91, CDR2 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența aminoacidă a SECV. ID NR: 92 și CDR3 a regiunii variabile a lanțului ușor cuprinzând secvența aminoacidă a SECV. ID NR: 93.

3. Anticorp sau fragment al acestuia de legare a antigenului conform revendicării 1, în care anticorpul sau fragmentul de legare a antigenului conține:

a. o regiune variabilă a lanțului greu conținând secvența aminoacidă a SECV. ID NR: 94 și o regiune variabilă a lanțului ușor conținând secvența aminoacidă a SECV. ID NR: 95;

b. o regiune variabilă a lanțului greu conținând secvența aminoacidă a SECV. ID NR: 128 și o regiune variabilă a lanțului ușor conținând secvența aminoacidă a SECV. ID NR: 132;

c. o regiune variabilă a lanțului greu conținând secvența aminoacidă a SECV. ID NR: 127 și o regiune variabilă a lanțului ușor conținând secvența aminoacidă a SECV. ID NR: 130;

d. o regiune variabilă a lanțului greu conținând secvența aminoacidă a SECV. ID NR: 128 și o regiune variabilă a lanțului ușor conținând secvența aminoacidă a SECV. ID NR: 133;

e. o regiune variabilă a lanțului greu, conținând cel puțin 97% identitate a secvenței aminoacide cu SECV. ID NR: 128 și o regiune variabilă a lanțului ușor conținând cel puțin 97% identitate a secvenței aminoacide cu SECV. ID NR: 132, în care orice variații ale secvenței se întâlnesc în regiunile de cadru ale anticorpului;

f. o regiune variabilă a lanțului greu, conținând cel puțin 97% identitate a secvenței aminoacide cu SECV. ID NR: 127 și o regiune variabilă a lanțului ușor conținând cel puțin 97% identitate a secvenței aminoacide cu SECV. ID NR: 130, în care orice variații ale secvenței se întâlnesc în regiunile de cadru ale anticorpului; sau

g. o regiune variabilă a lanțului greu, conținând cel puțin 97% identitate a secvenței aminoacide cu SECV. ID NR: 128 și o regiune variabilă a lanțului ușor conținând cel puțin 97% identitate a secvenței aminoacide cu SECV. ID NR: 133, în care orice variații ale secvenței se întâlnesc în regiunile de cadru ale anticorpului.

4. Anticorp sau fragment de legare a antigenului, conform oricăreia dintre revendicările 1-3, în care anticorpul se leagă la TIGIT uman cu o valoare a  $K_D$  de aproximativ  $1 \times 10^{-9}$  M până la aproximativ  $1 \times 10^{-12}$  M, așa cum a fost determinat prin rezonanța plasmonică de suprafață.

5. Anticorp sau fragment de legare a antigenului, conform oricăreia dintre revendicările 1-4, în care anticorpul conține două lanțuri grele și două lanțuri ușoare.

6. Anticorp sau fragment de legare a antigenului, conform oricăreia dintre revendicările 1-4, care este un anticorp umanizat, care conține un domeniu constant IgG1 uman și un domeniu constant kappa uman.

7. Anticorp sau fragment de legare a antigenului, conform oricăreia dintre revendicările anterioare, care reprezintă un anticorp umanizat, care conține un domeniu constant IgG4 uman și un domeniu constant kappa uman.

8. Anticorp, conform revendicării 6, în care domeniul constant IgG1 uman conține secvența aminoacidă a SECV. ID NR: 86 și domeniul constant kappa uman conține secvența aminoacidă a SECV. ID NR: 56.

9. Anticorp, conform revendicării 7, în care domeniul constant IgG4 uman conține secvența aminoacidă a SECV. ID NR: 55 și domeniul constant kappa uman conține secvența aminoacidă a SECV. ID NR: 56.

10. Anticorp, conform revendicării 2, care reprezintă un anticorp izolat conținând două imunoglobuline a lanțului greu și două imunoglobuline a lanțului ușor, în care fiecare imunoglobulină a lanțului greu cuprinde (i) o regiune variabilă a lanțului greu conținând secvența aminoacidă a SECV. ID NR: 128 și (ii) un domeniu constant IgG1 cuprinzând secvența aminoacidă a SECV. ID NR: 86 și în care fiecare imunoglobulină a lanțului ușor conține (i) o regiune variabilă a lanțului ușor cuprinzând secvența aminoacidă a SECV. ID NR: 132 și (ii) un domeniu constant kappa uman cuprinzând secvența aminoacidă a SECV. ID NR: 56.

11. Anticorp, conform revendicării 2, care reprezintă un anticorp izolat conținând două imunoglobuline a lanțului greu și două imunoglobuline a lanțului ușor, în care fiecare imunoglobulină a lanțului greu cuprinde (i) o regiune variabilă a lanțului greu conținând secvența aminoacidă a SECV. ID NR: 128 și (ii) un domeniu constant IgG1 cuprinzând secvența aminoacidă a SECV. ID NR: 86, și în care fiecare imunoglobulină a lanțului ușor conține (i) o regiune variabilă a lanțului ușor cuprinzând secvența aminoacidă a SECV. ID NR: 133 și (ii) un domeniu constant kappa uman cuprinzând secvența aminoacidă a SECV. ID NR: 56.

12. Anticorp, conform revendicării 2, care reprezintă un anticorp izolat conținând două imunoglobuline a lanțului greu și două imunoglobuline a lanțului ușor, în care fiecare imunoglobulină a lanțului greu cuprinde (i) o regiune variabilă a lanțului greu conținând secvența aminoacidă a SECV. ID NR: 127 și (ii) un domeniu constant IgG1 cuprinzând secvența aminoacidă a SECV. ID NR: 86 și în care fiecare imunoglobulină a lanțului ușor conține (i) o regiune variabilă a lanțului ușor cuprinzând secvența aminoacidă a SECV. ID NR: 130 și (ii) un domeniu constant kappa uman cuprinzând secvența aminoacidă a SECV. ID NR: 56.

13. Anticorp sau fragment de legare a antigenului, conform oricăreia dintre revendicările 1-12, care este un anticorp, anticorpul fiind produs într-o celulă CHO.

14. Moleculă de acid nucleic izolat, care codifică i) o regiune variabilă a lanțului greu a anticorpului sau fragmentului acestuia de legare a antigenului, conform oricăreia dintre revendicările 1-13 sau ii) o regiune variabilă a lanțului ușor a anticorpului sau a fragmentului acestuia de legare a antigenului, conform oricăreia dintre revendicările 1-13.

15. Moleculă de acid nucleic izolat, conform revendicării 14, în care regiunea variabilă a lanțului greu conține setul de secvențe aminoacide prezente în oricare dintre SECV. ID NR: 94, 128 sau 127, sau regiunea variabilă a lanțului ușor conține setul de secvențe aminoacide în oricare dintre SECV. ID NR: 95, 132, 130 sau 133.

16. Vector de expresie cuprinzând acidul nucleic izolat, conform revendicării 14.

17. Celula gazdă cuprinzând vectorul de expresie, conform revendicării 16.

18. Celula gazdă, conform revendicării 17, care prezintă o celulă *Pichia* sau o celulă ovariană de hamster chinezesc.

19. Compoziție cuprinzând anticorpul sau fragmentul de legare a antigenului, conform oricăreia dintre revendicările 1-13 și un purtător acceptabil farmaceutic sau un diluant.

20. Compoziție, conform revendicării 19, cuprinzând suplimentar un agent, selectat din grupa constând din:

- a. anticorp anti-PD1 sau fragment al acestuia de legare a antigenului;
- b. anticorp anti-LAG3 sau fragment al acestuia de legare a antigenului;
- c. anticorp anti-VISTA sau fragment al acestuia de legare a antigenului;
- d. anticorp anti-BTLA sau fragment al acestuia de legare a antigenului;
- e. anticorp anti-TIM3 sau fragment al acestuia de legare a antigenului;
- f. anticorp anti-CTLA4 sau fragment al acestuia de legare a antigenului;
- g. anticorp anti-HVEM sau fragment al acestuia de legare a antigenului;
- h. anticorp anti-CD27 sau fragment al acestuia de legare a antigenului;

- i. anticorp anti-CD137 sau fragment al acestuia de legare a antigenului;
- j. anticorp anti-OX40 sau fragment al acestuia de legare a antigenului;
- k. anticorp anti-CD28 sau fragment al acestuia de legare a antigenului;
- l. anticorp anti-PDL1 sau fragment al acestuia de legare a antigenului;
- m. anticorp anti-PDL2 sau fragment al acestuia de legare a antigenului;
- n. anticorp anti-GITR sau fragment al acestuia de legare a antigenului;
- o. anticorp anti-ICOS sau fragment al acestuia de legare a antigenului;
- p. anticorp anti-SIRP $\alpha$  sau fragment al acestuia de legare a antigenului;
- q. anticorp anti-ILT2 sau fragment al acestuia de legare a antigenului;
- r. anticorp anti-ILT3 sau fragment al acestuia de legare a antigenului;
- s. anticorp anti-ILT4 sau fragment al acestuia de legare a antigenului; și
- t. anticorp anti-ILT5 sau fragment al acestuia de legare a antigenului.

21. Compoziție, conform revendicării 20, în care anticorpul anti-PD1 sau fragmentul acestuia de legare a antigenului este selectat din grupa constând din: pembrolizumab sau un fragment al acestuia de legare a antigenului și nivolumab sau un fragment al acestuia de legare a antigenului.

22. Compoziție, conform revendicării 21, în care anticorpul anti-PD1 reprezintă pembrolizumab.

23. Compoziție, conform revendicării 20, în care compoziția conține adițional un anticorp anti-PDL1 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului.

24. Metodă de preparare a unui anticorp sau a unui fragment al acestuia de legare a antigenului, conform oricăreia din revendicările 1-13, cuprinzând:

a. cultivarea unei celule gazdă în condiții potrivite, în care celula gazdă conține:

(i) o secvență de nucleotide, care codifică regiunea variabilă a lanțului greu a anticorpului sau fragmentului acestuia de legare a antigenului; și

(ii) o secvență de nucleotide, care codifică regiunea variabilă a lanțului ușor a anticorpului sau fragmentului acestuia de legare a antigenului; și

b. opțional, izolarea anticorpului sau a fragmentului de legare a antigenului din celula gazdă și/sau din mediul de cultură.

25. Anticorp sau fragment de legare a antigenului, conform oricăreia din revendicările 1-13, pentru utilizare într-o metodă de tratament al cancerului la un subiect uman.

26. Anticorp sau fragment de legare a antigenului, conform revendicării 25, pentru utilizare opțional în asociere cu un alt agent terapeutic sau procedură terapeutică.

27. Anticorp sau fragment de legare a antigenului, conform oricăreia din revendicările 1-13, pentru utilizare într-o metodă de tratament a unei infecții sau a unei boli infecțioase la un subiect uman.

28. Anticorp sau fragment de legare a antigenului, conform revendicării 27, pentru utilizare opțional în asociere cu un alt agent terapeutic sau procedură terapeutică.

29. Anticorp sau fragment de legare a antigenului, conform oricăreia din revendicările 1-13, pentru utilizare într-o metodă de tratament al cancerului în combinație cu un anticorp anti-PD1 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului.

30. Anticorp sau fragment de legare a antigenului, conform revendicării 29, pentru utilizare în care anticorpul anti-PD1 sau fragmentul acestuia de legare la antigen este selectat din grupa constând din pembrolizumab sau un fragment al acestuia de legare a antigenului și nivolumab sau un fragment al acestuia de legare a antigenului.

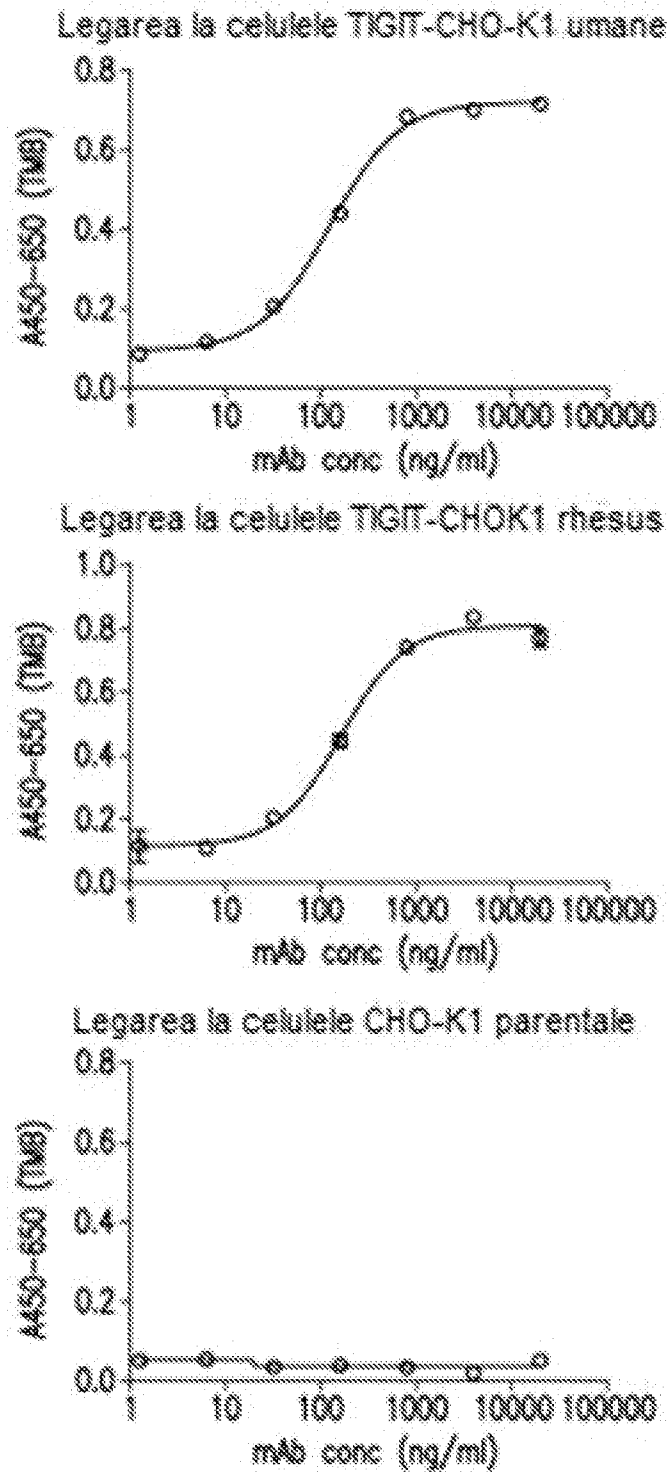


fig. 1

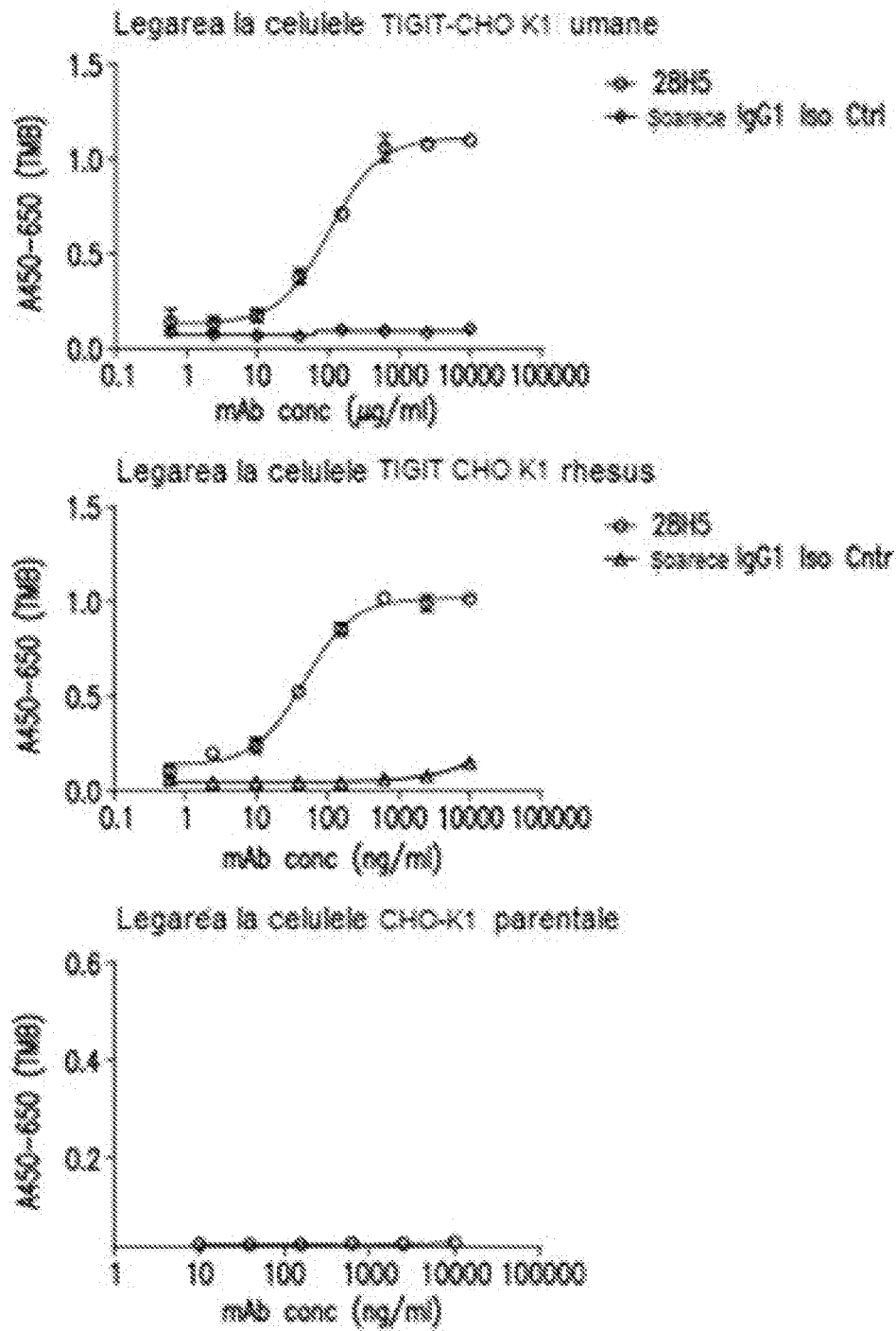


fig. 2

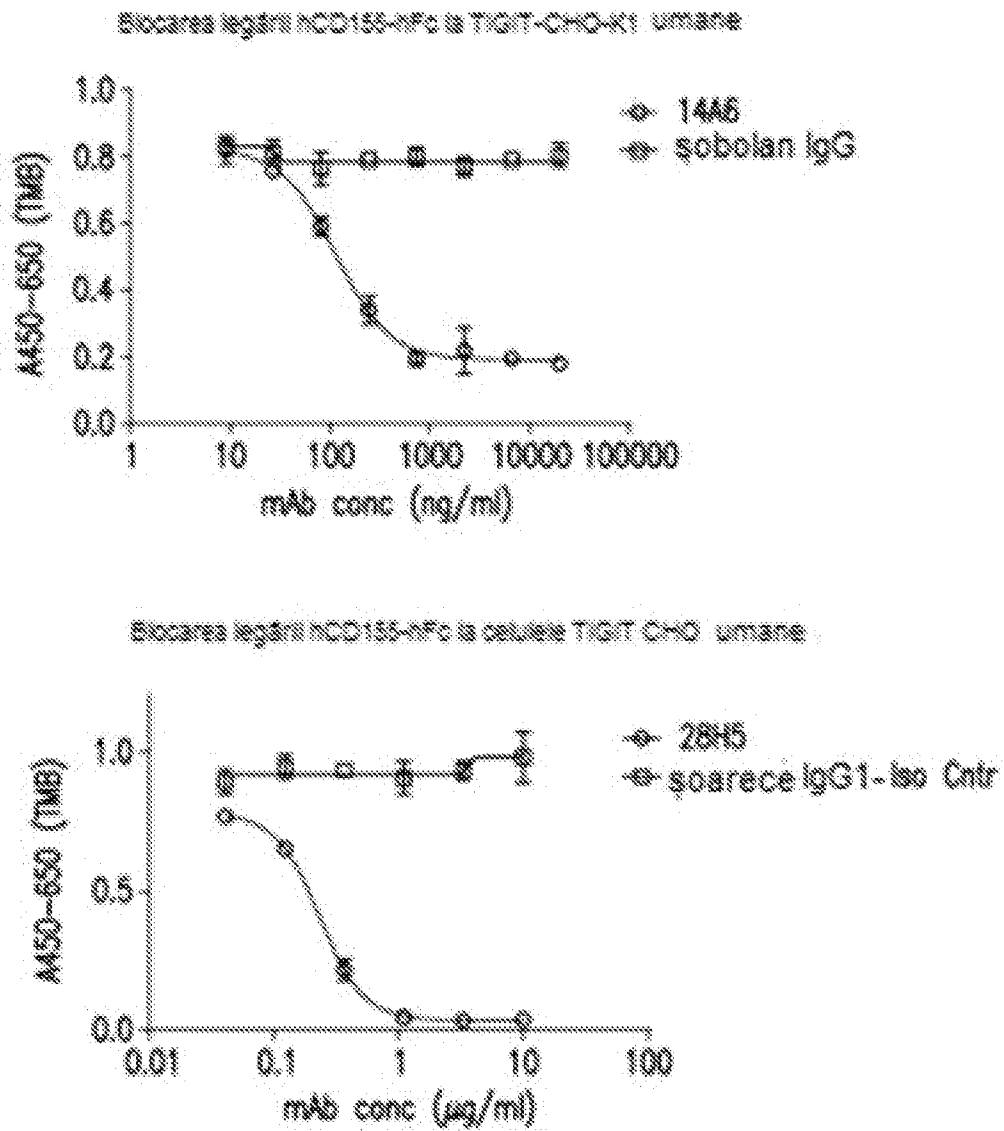


fig. 3

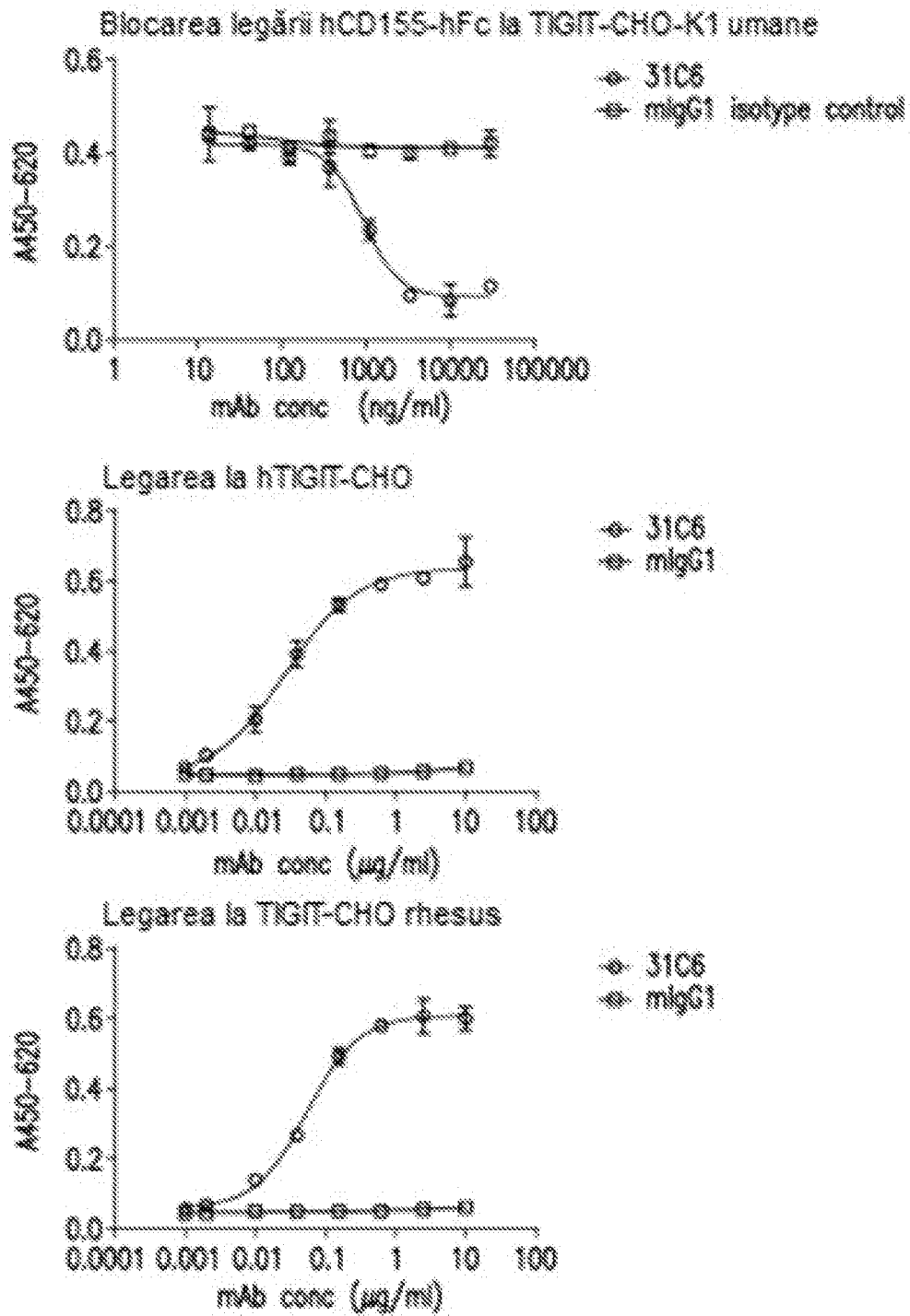


fig. 4

Titrarea anticorpilor anti-TIGIT umani în testul funcțional bazat pe celule

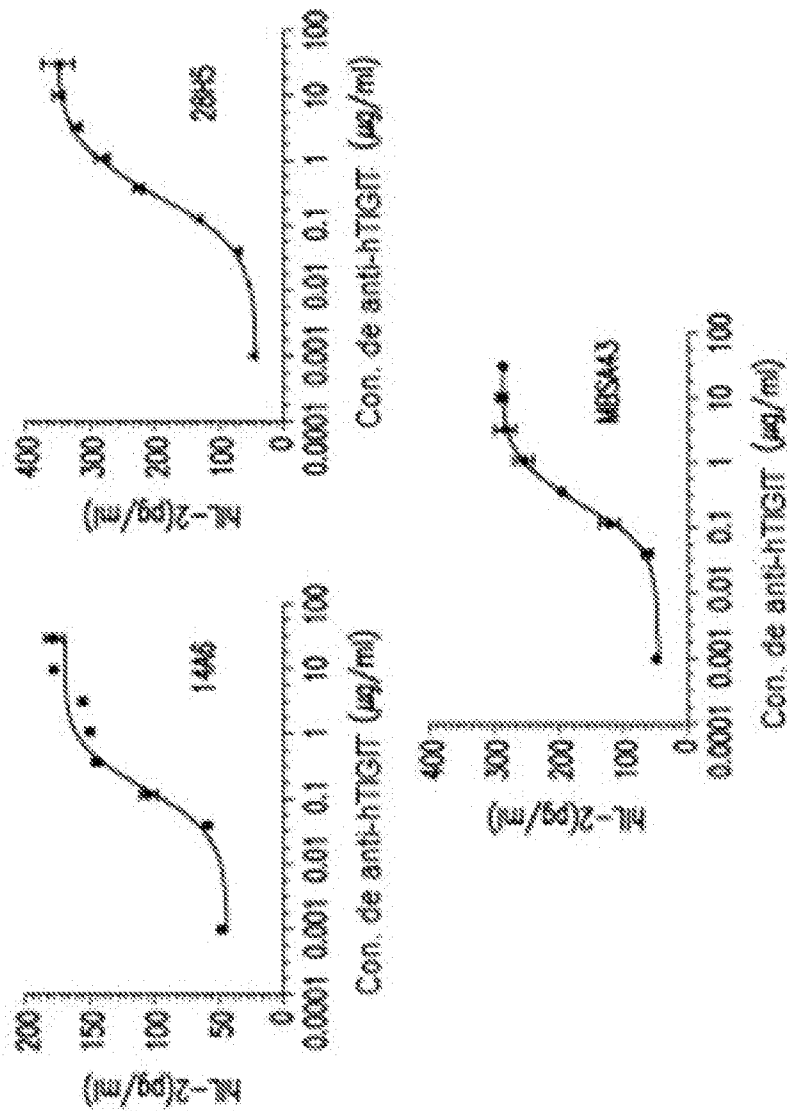


fig. 5

Titrare anticorpilor anti-TIGIT umani în testul funcțional bazat pe celule

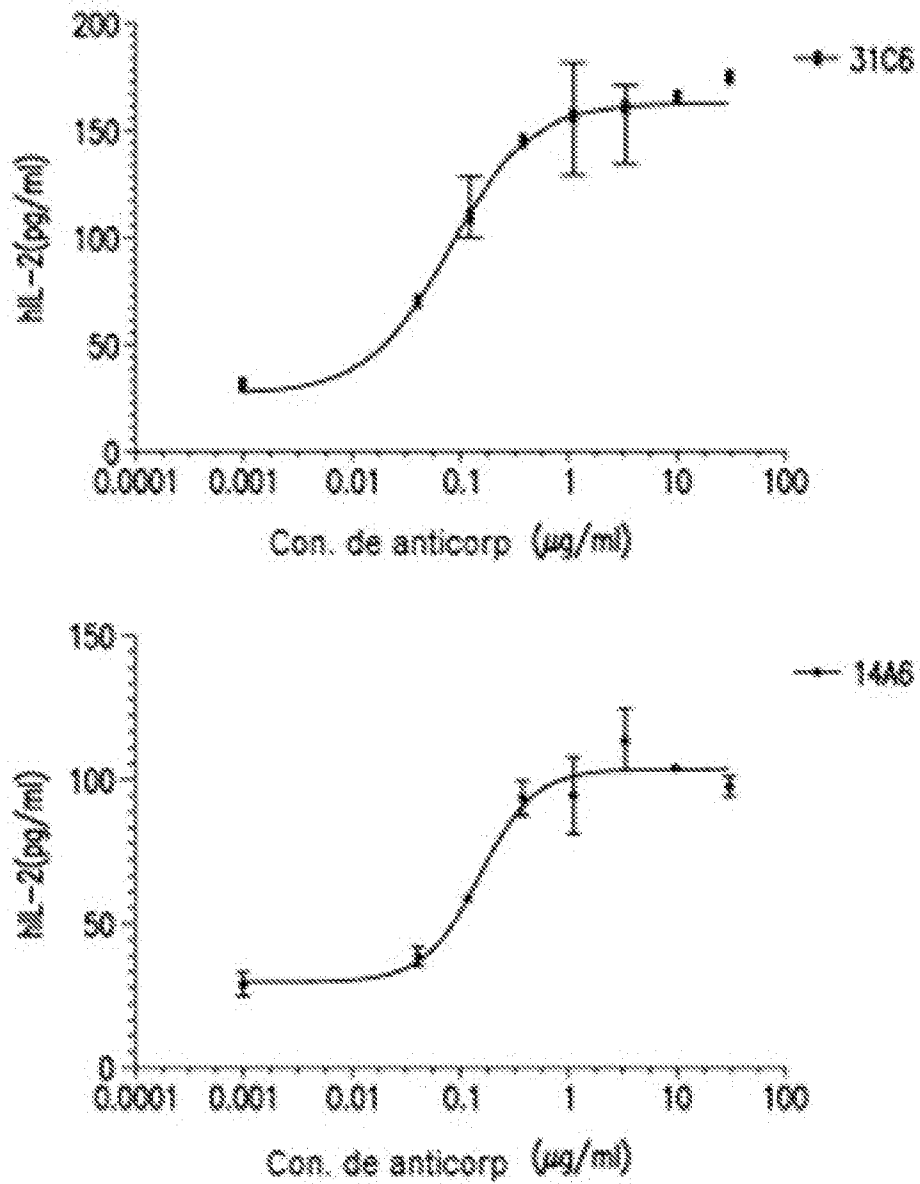


fig. 6

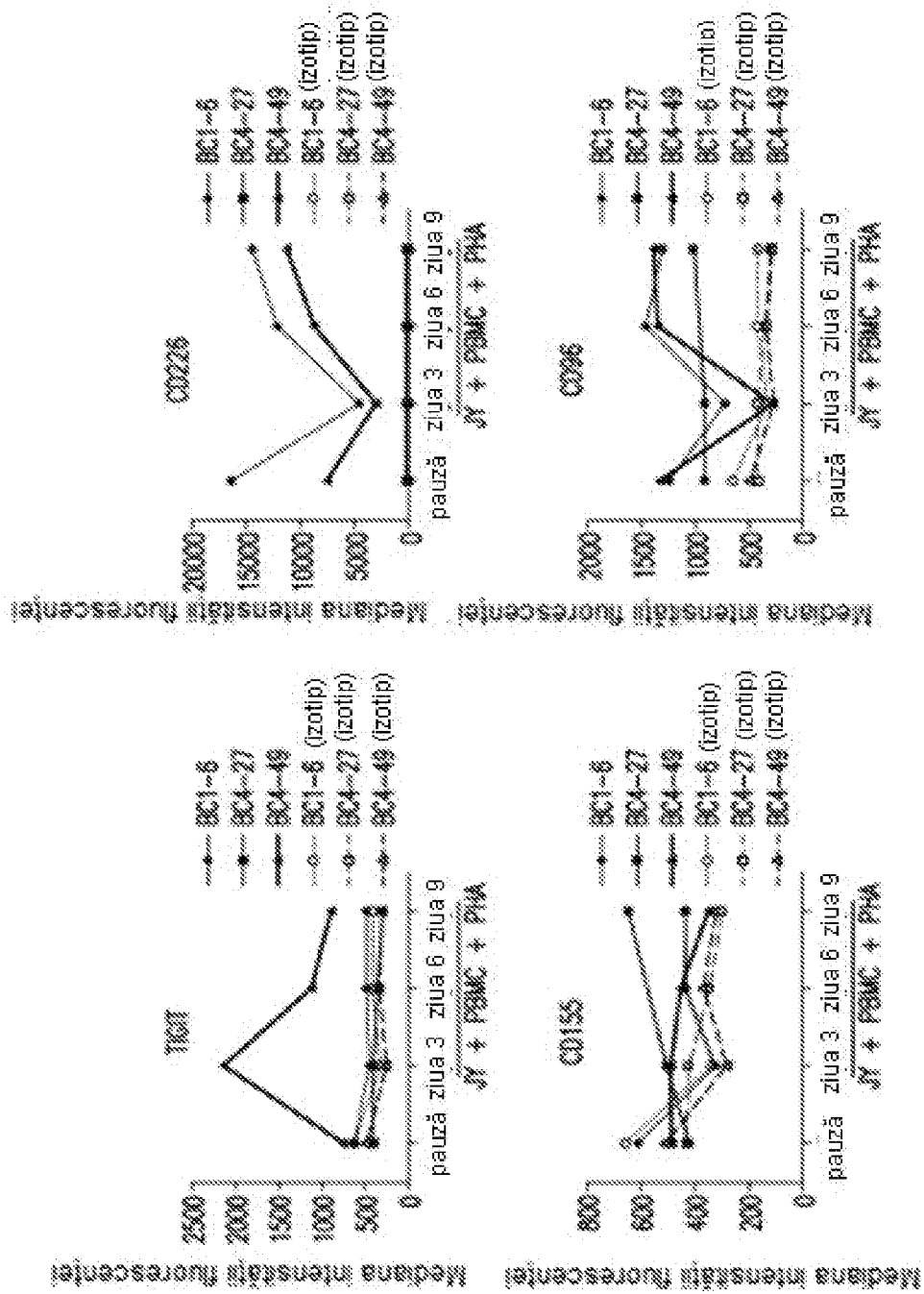


fig. 7

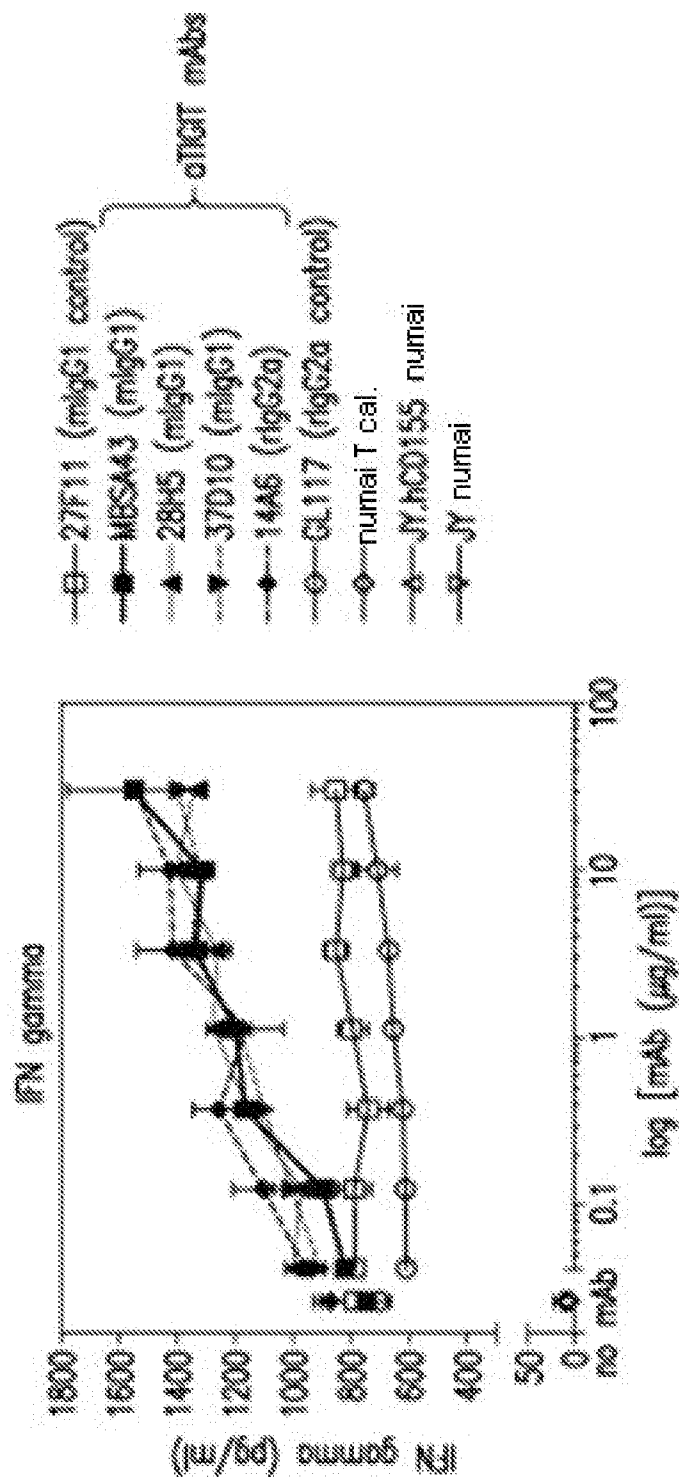


fig. 8A

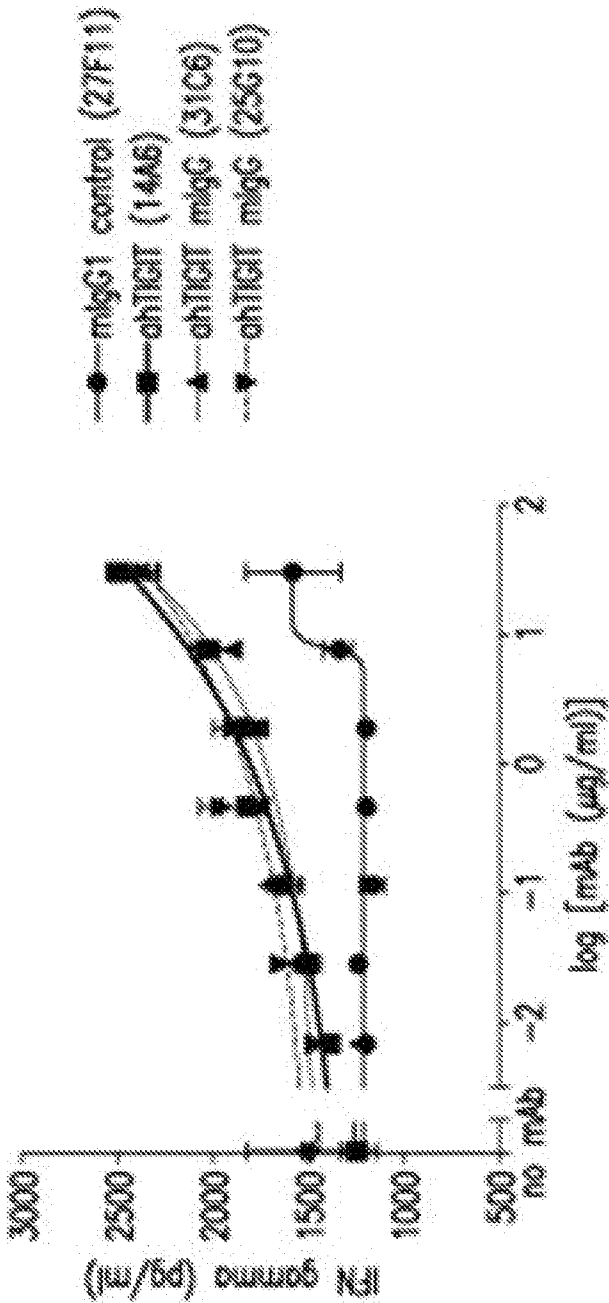


fig. 8B

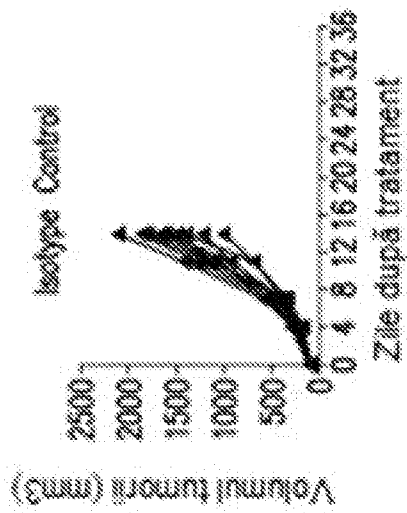


fig. 9B

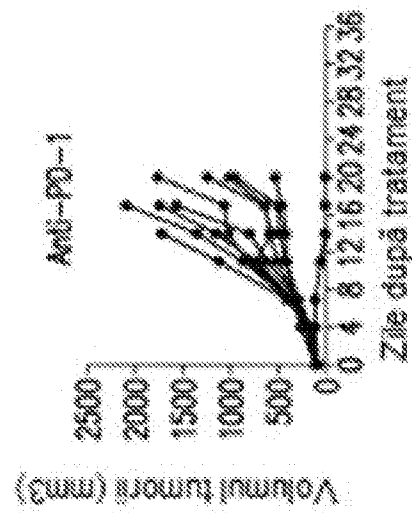


fig. 9D

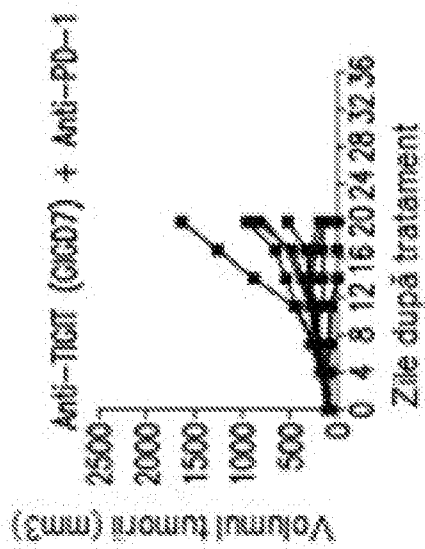


fig. 9A

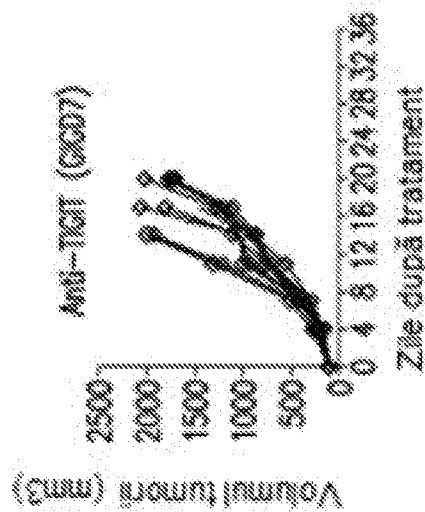


fig. 9C

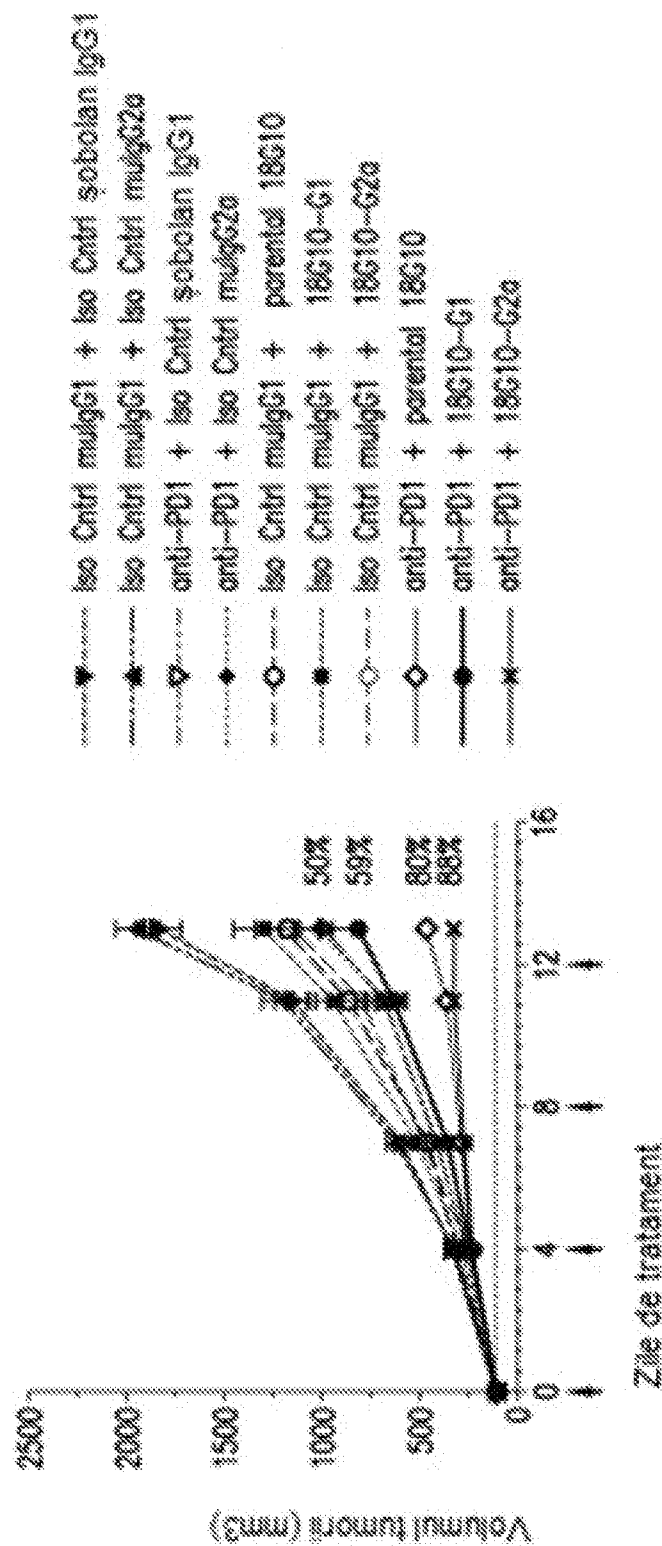


fig. 10

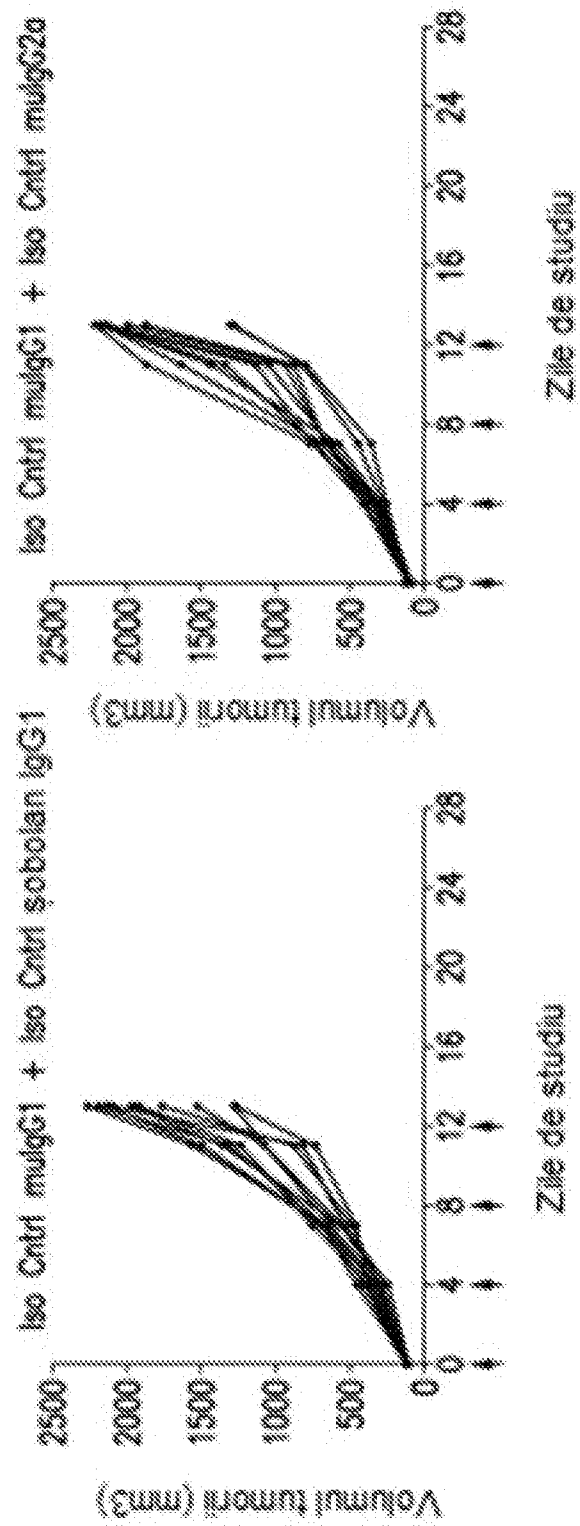


fig. 11A

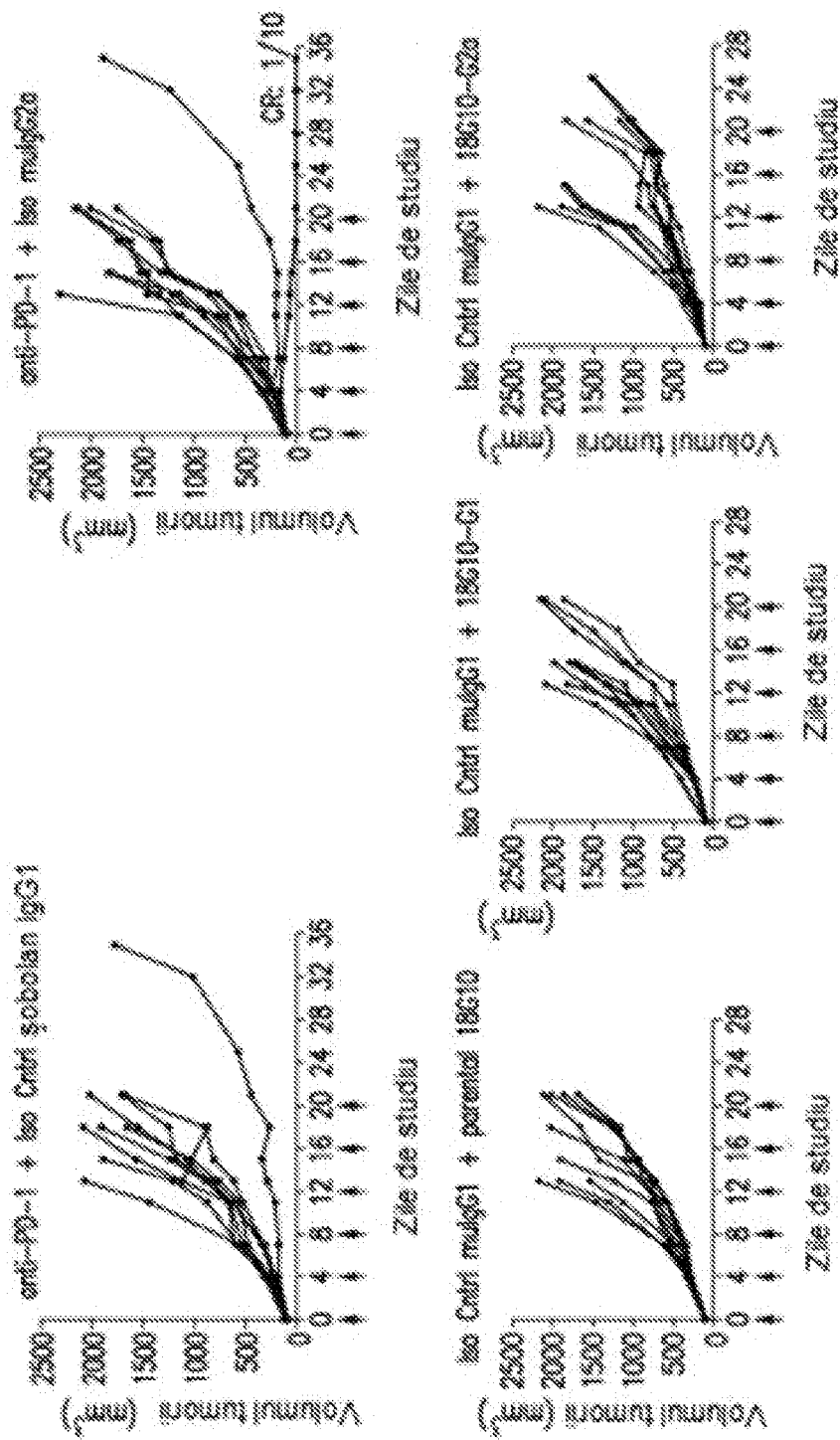


fig. 11B

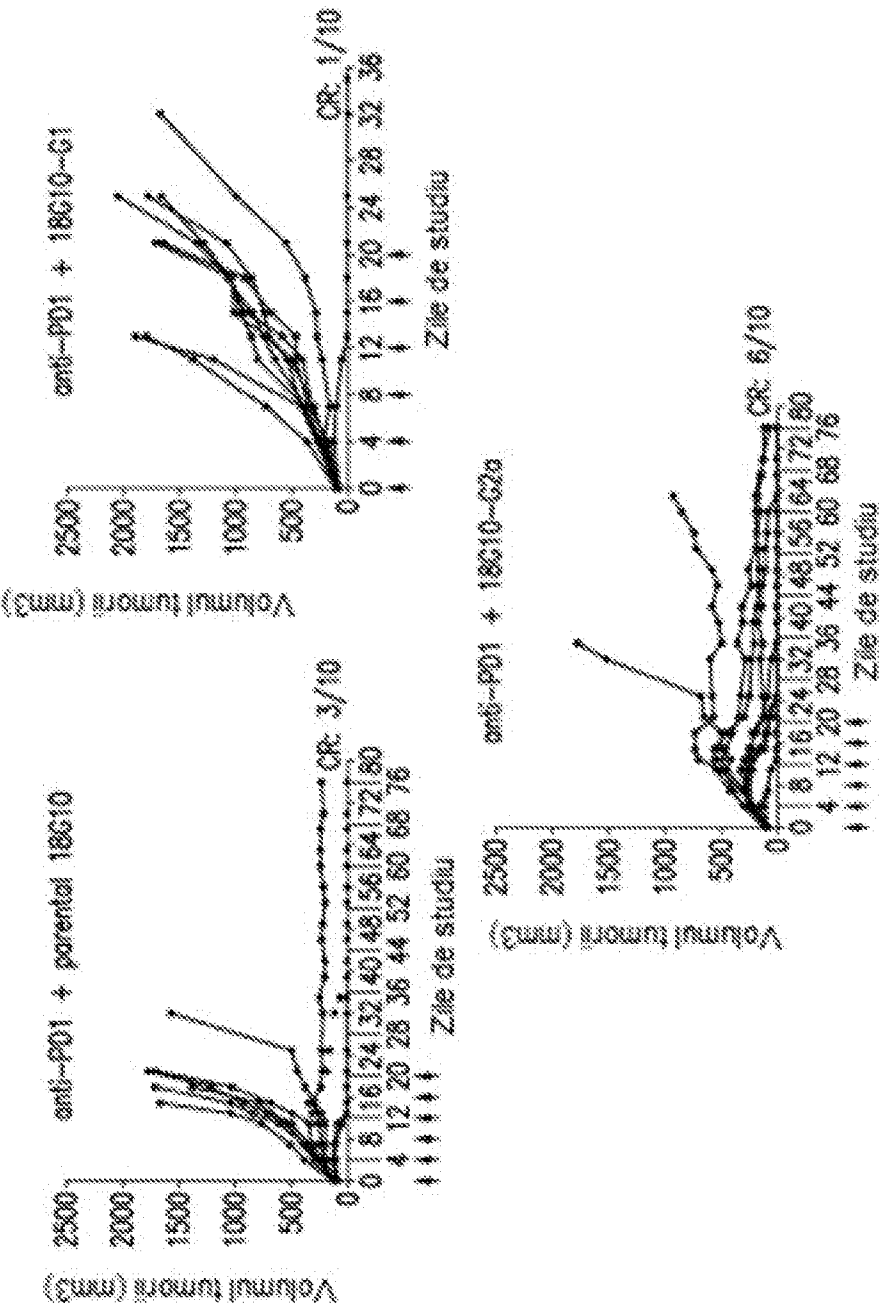


fig. 11C

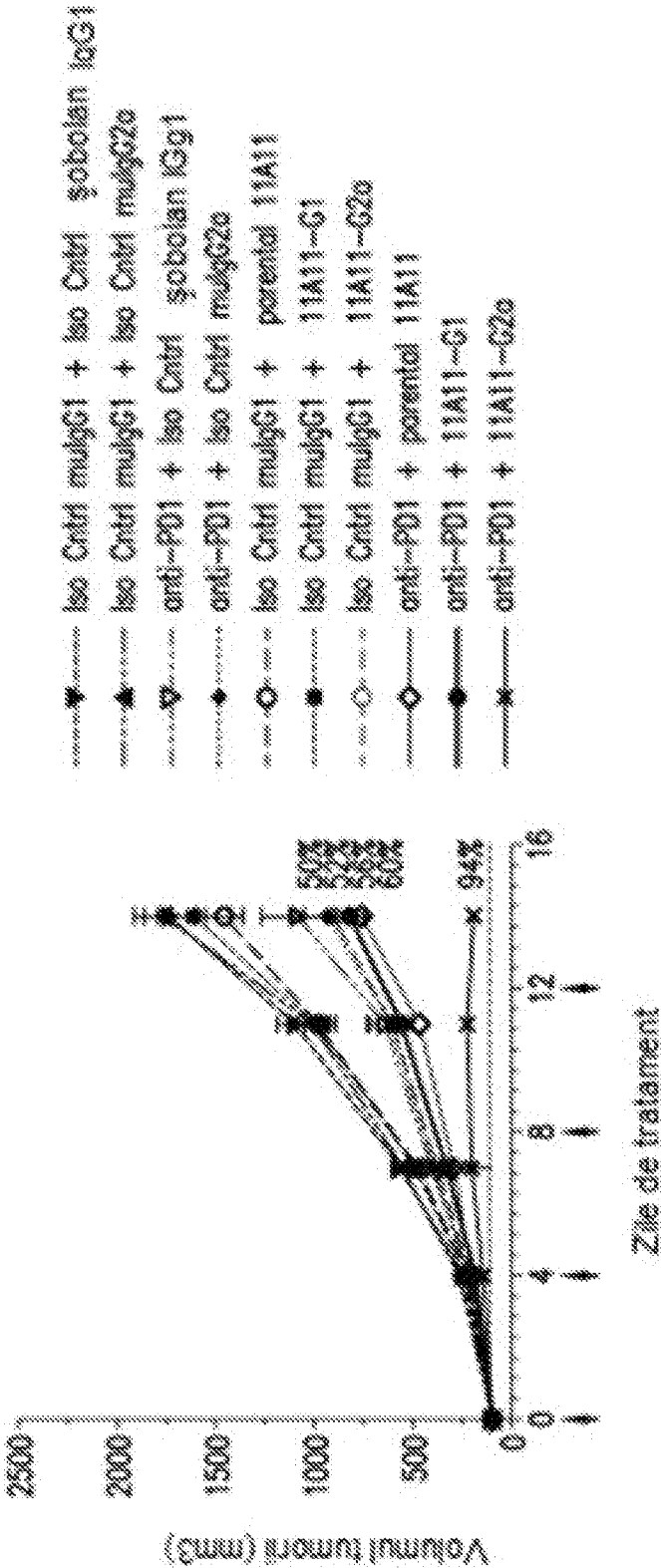


fig. 12

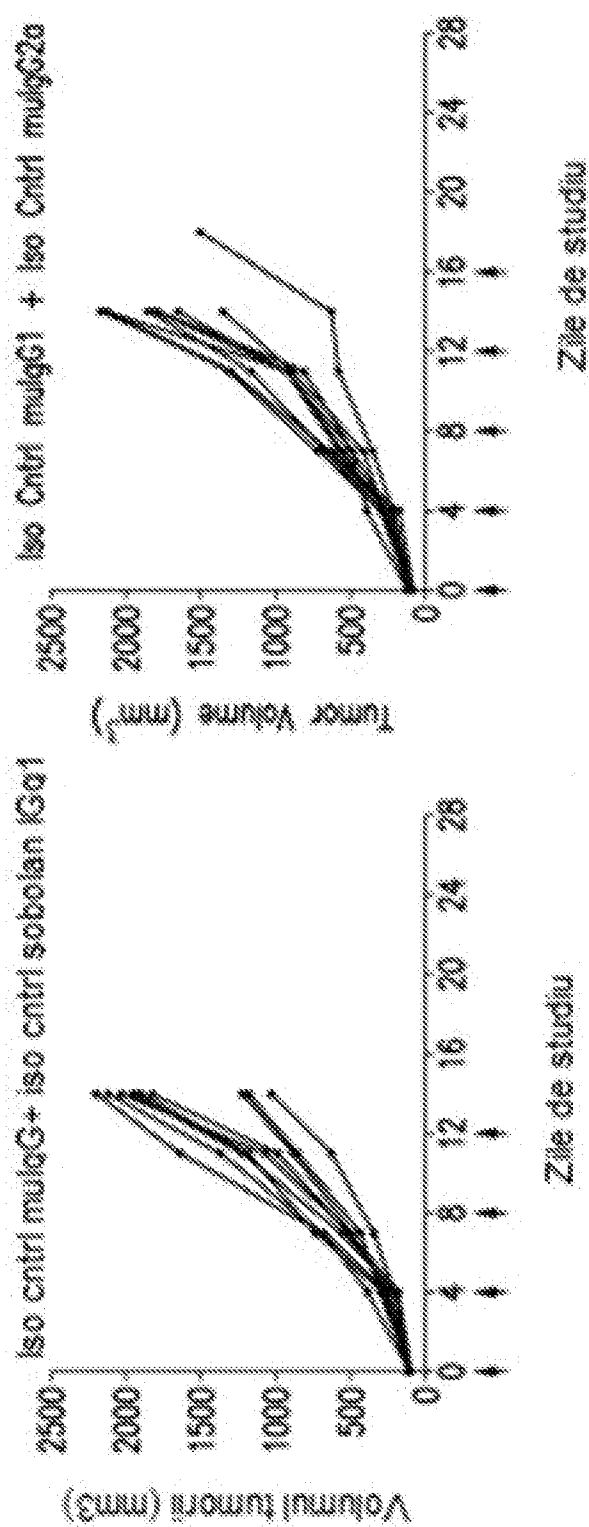


fig. 13A

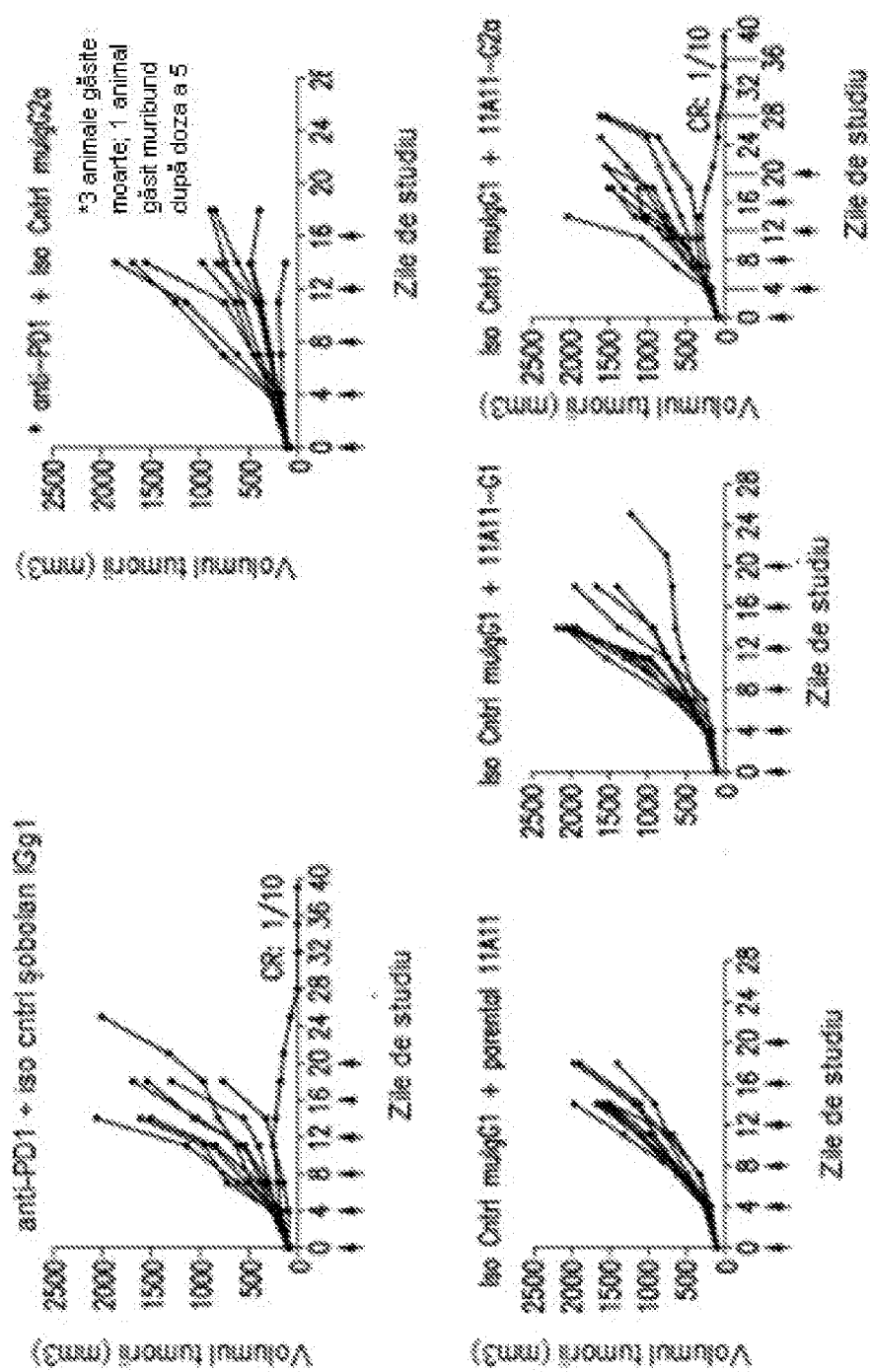


fig. 13B

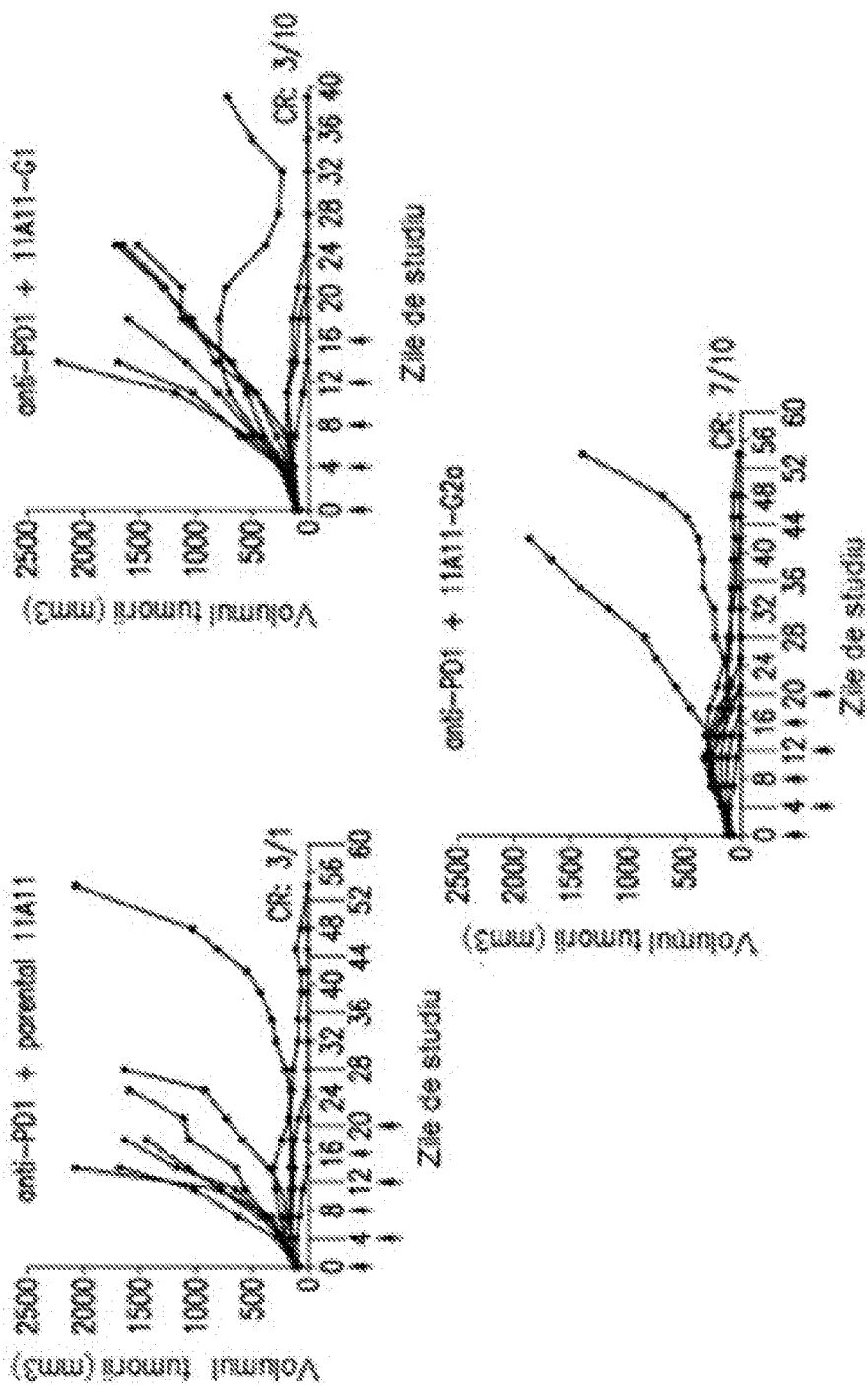


fig. 13C

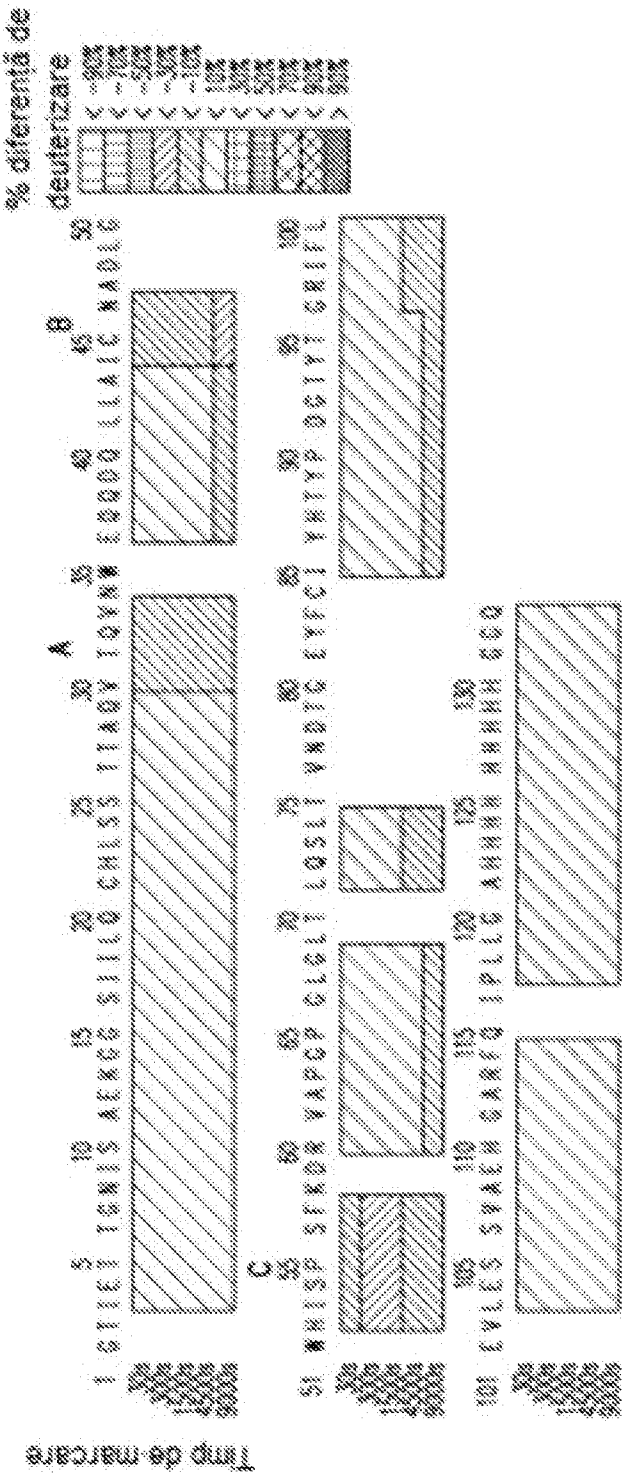


fig. 14

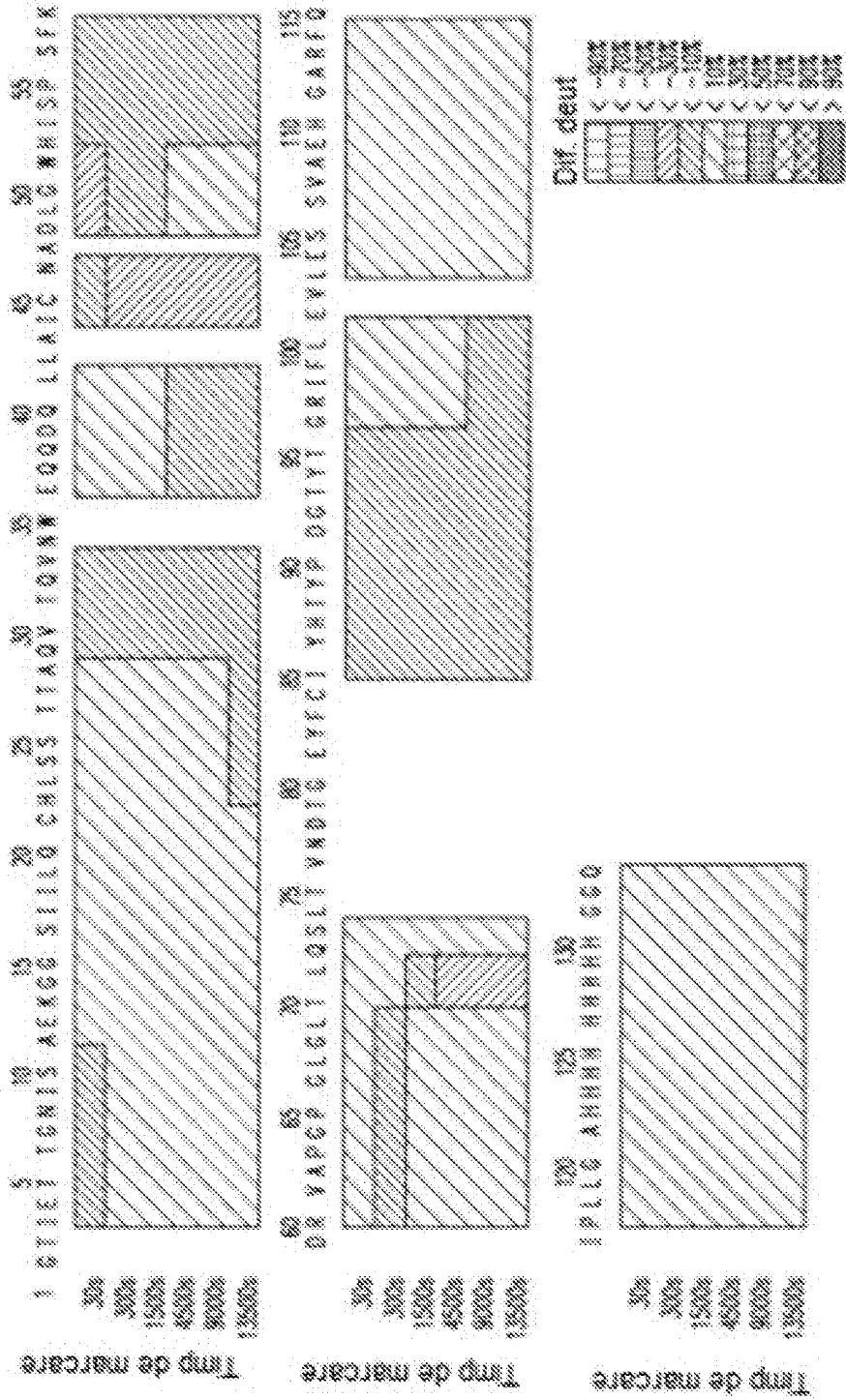


fig. 15

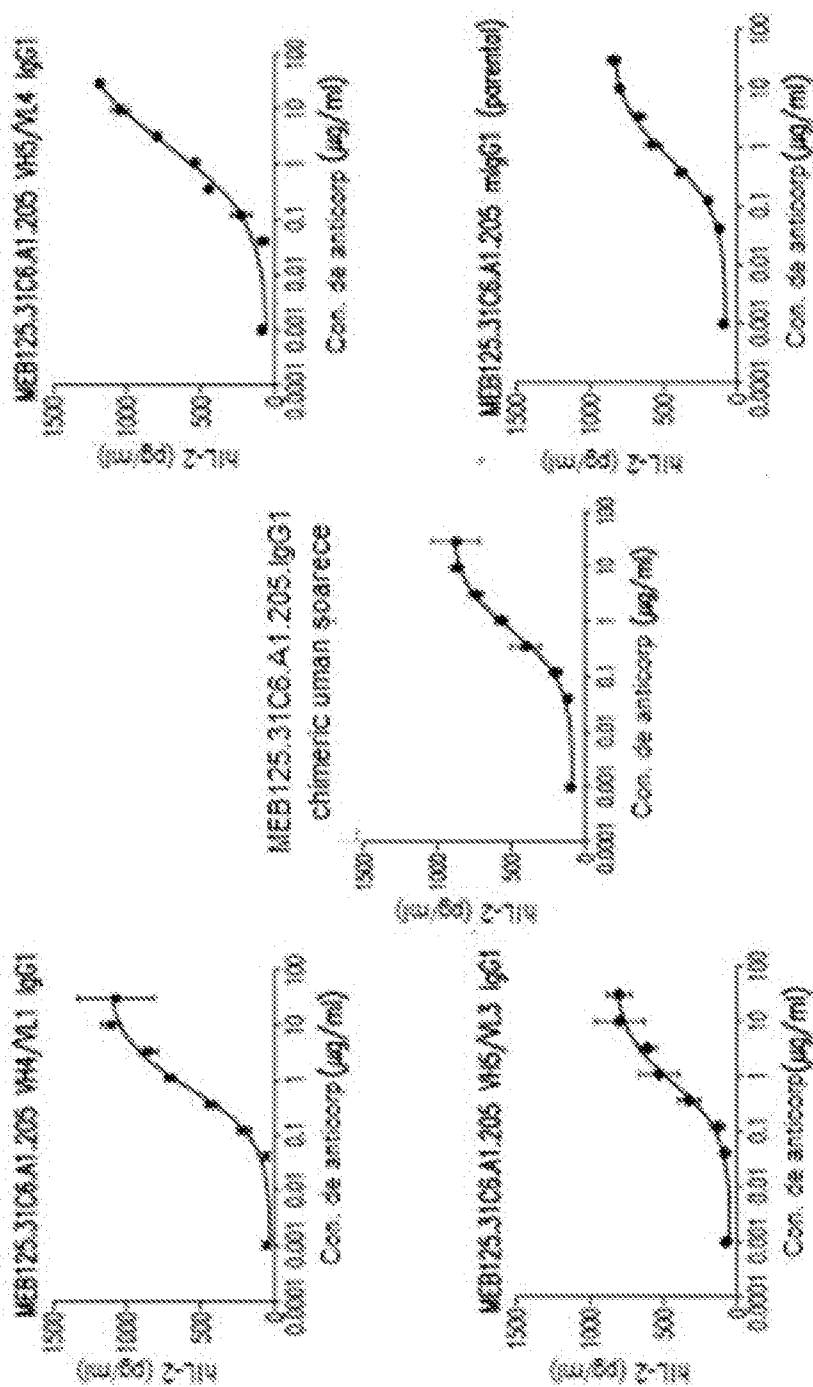


fig. 16

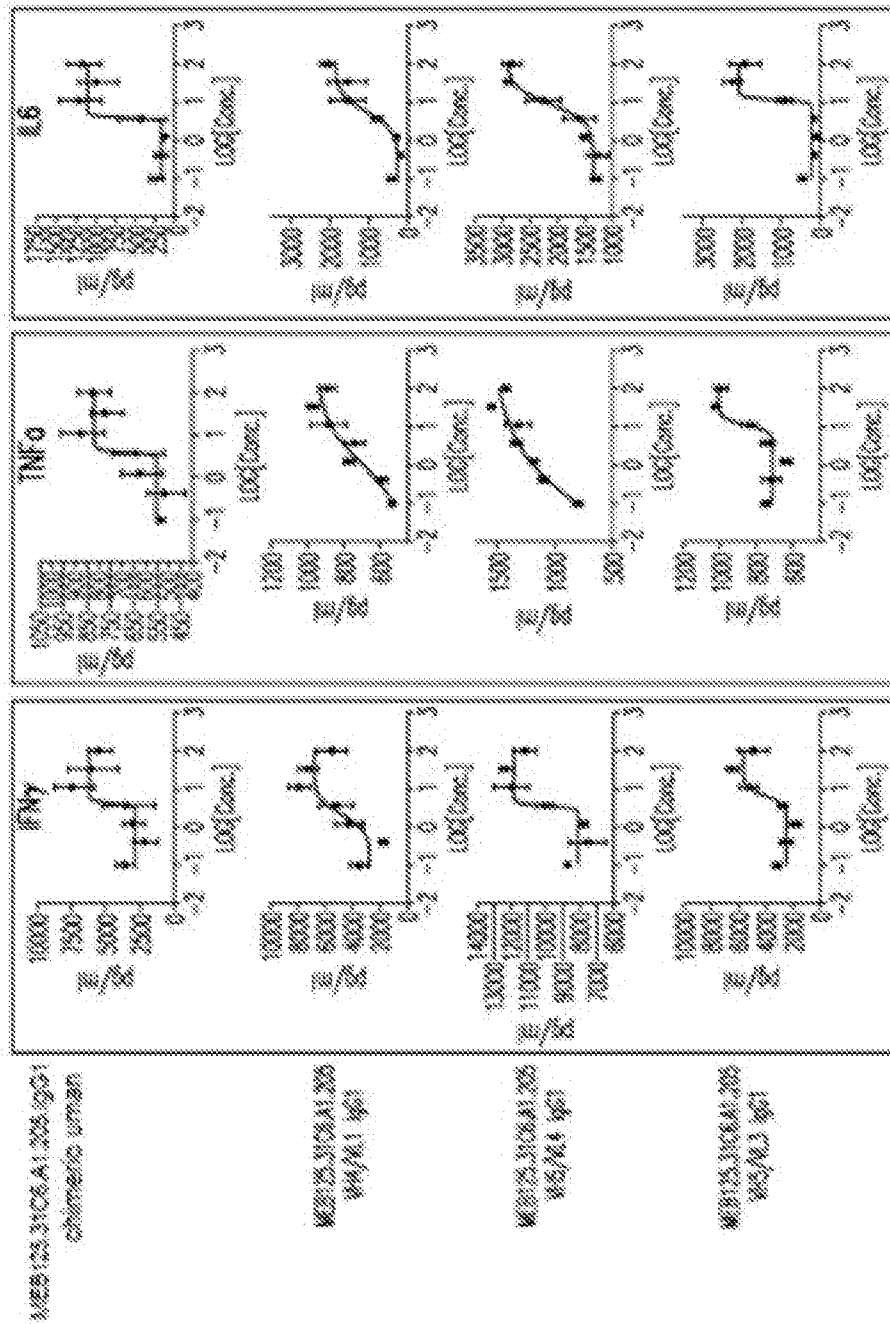


fig. 17

**RAPORT DE DOCUMENTARE**

**I. Datele de identificare a cererii**

(21) Nr. depozit: a 2017 0032 (32) Data de prioritate recunoscută:  
2014.08.19; 2015.03.02

(22) Data depozit: 2015.08.17 Raport de documentare internațională: ☒ da  
(85) Data deschiderii fazei naționale: 2017.03.16  
(86) Cerere internațională: PCT/US2015/045447, 2015.08.17  
(87) Publicarea cererii internaționale: WO 2016/028656 A1, 2016.02.25  
(71) Solicitant: **MERCK SHARP & DOHME CORP., US**  
(54) **Titlul: Anticorpi anti-TIGIT**

**II. Clasificarea obiectului invenției:**

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

**III. Colecții și Baze de date de brevete cercetate (denumirea, termeni caracteristici, ecuații de căutare reprezentative)**

**MD - Intern « Documentare Invenții »** (inclusiv cereri nepublicate; trunchiere automată stanga/dreapta): **Int.Cl: A61K 39/00** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 37/02** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)

anti-TIGIT, cancer

**"Worldwide" (Espacenet): Int.Cl: A61K 39/00** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 37/02** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)

anti-TIGIT, cancer

**EA, CIS (Eapatis): Int.Cl: A61K 39/00** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 37/02** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)

анти-TIGIT, пак

**SU (certificate de autor): Int.Cl: A61K 39/00** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 37/02** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)

анти-TIGIT, пак

**Patsearch- Int.Cl: A61K 39/00** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 37/02** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)

anti-TIGIT, cancer

**IV. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate**

| V. Documente considerate a fi relevante |                                                                                                                                                                                                                         |                             |
|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| Categoria*                              | Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente                                                                                                                        | Numărul revendicării vizate |
| X, P                                    | JOHNSTON ROBERT J ET AL: "The Immunoreceptor TIGIT Regulates Antitumor and Antiviral CD8+T Cell Effector Function", CANCER CELL, CELL PRESS, US, vol. 26, no. 6, 26 November 2014, p. 923-937, XP029111576              | 1-34                        |
| X                                       | E. LOZANO ET AL: "The TIGIT/CD226 Axis Regulates Human T Cell Function", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 188, no. 8, 16 March 2012, p. 3869-3875, XP055147473                                                           | 1-34                        |
| X                                       | N. STANIETSKY ET AL: "The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 106, no. 42, 20 October 2009, p. 17858-17863, XP055215810 | 1-34                        |
| X                                       | STEVEN D. LEVIN ET AL: "Vstm3 is a member of the CD28 family and an important modulator of T-cell function", EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 41, no. 4, 18 April 2011, p. 902-915, XP055215809                     | 1-34                        |
| X                                       | WO 2009/126688 A2 2009.10.15                                                                                                                                                                                            | 1-34                        |
| A                                       | WO 2014/089169 A2 2014.06.12                                                                                                                                                                                            | 1-34                        |
| A                                       | S.R.Goding et al. Restoring Immune Function of Tumor-Specific CD4+T Cells during Recurrence of Melanoma. The Journal of Immunology, vol. 190, no 9, 2013.03.27, p. 4899-4909, XP055145038                               | 1-34                        |
| A                                       | Tao Zhang et al. Increased expression of TIGIT on CD4-T cells ameliorates immune-mediated bone marrow failure of aplastic anemia. Journal of Cellular Biochemistry, 2014.06.01, XP055216805                             | 1-34                        |
| A                                       | B. Allard et al. Targeting CD73 Enhances the Antitumor Activity of Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 mAbs. Clinical Cancer Research, vol.19, no 20, 2013.10.15, p. 5626-5635, XP055216360                                       | 1-34                        |

|                                                             |                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                  |
|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                             |                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                  |
| A                                                           | Amanda C. Foks et al. Agonistic Anti-TIGIT Treatment Inhibits T Cell Responses in LDLr Deficient Mice without Affecting Atherosclerotic Lesion Development. PLOS ONE, vol. 8, no 12, 2013.12.20, p. e83134, XP055215806 | 1-34                                                                                                                                                                                                                             |
| A                                                           | Derek A. Wainwright et al. Targeting Tregs in Malignant Brain Cancer: Overcoming IDO. FRONTIERS IN IMMUNOLOGY, vol. 4, 1 January 2013, XP055211742                                                                      | 1-34                                                                                                                                                                                                                             |
| A                                                           | Cristina Bottino et al. Natural Killer Cells and Neuroblastoma: Tumor Recognition, Escape Mechanisms, and Possible Novel Immunotherapeutic Approaches. FRONTIERS IN IMMUNOLOGY, vol. 5, 1 January 2014, XP055216363     | 1-34                                                                                                                                                                                                                             |
| A, D                                                        | Pluckthun. The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore edit. Springer-Verlag. New York, 1994, p. 269-315                                                                                   | 1-34                                                                                                                                                                                                                             |
| A, D                                                        | Muyldermans et al. Trends Biochem. Sci. no 26, 2001, p. 230                                                                                                                                                             | 1-34                                                                                                                                                                                                                             |
| A, D                                                        | EP 0404097 A2 1990.12.27                                                                                                                                                                                                | 1-34                                                                                                                                                                                                                             |
| A, D                                                        | Kohler et al. Nature, no 256, 1975, p. 495                                                                                                                                                                              | 1-34                                                                                                                                                                                                                             |
| A, D, C                                                     | US 4816567 A 1989.03.28                                                                                                                                                                                                 | 1-34                                                                                                                                                                                                                             |
|                                                             |                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                  |
| <b>* categoriile speciale ale documentelor citate:</b>      |                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                  |
| <b>A</b> – document care definește stadiul anterior general |                                                                                                                                                                                                                         | <b>T</b> – document publicat după data depozitului sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidență principiul sau teoria pe care se bazează invenția |

|                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                      |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>X</b> – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă când documentul este luat în considerație de unul singur                    | <b>E</b> – document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta dată |
| <b>Y</b> – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe documente de aceeași categorie | <b>D</b> – document menționat în descrierea cererii de brevet                                        |
| <b>O</b> - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expoziție sau la orice alte mijloace de divulgare                                                                               | <b>C</b> – document considerat ca cea mai apropiată soluție                                          |
|                                                                                                                                                                                                              | <b>&amp;</b> – document, care face parte din aceeași familie de brevete                              |
| <b>P</b> - document publicat înainte de data de depozit, dar după data priorității invocate                                                                                                                  | <b>L</b> – document citat cu alte scopuri                                                            |
| Data finalizării documentării 2020.07.09                                                                                                                                                                     |                                                                                                      |
| Examinator GROSU Petru                                                                                                                                                                                       |                     |