

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202092895** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2021.04.23

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

(22) Дата подачи заявки
2019.07.19

(54) **АГОНИСТИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD226**

(31) 62/703,522; 62/795,744

(32) 2018.07.26; 2019.01.23

(33) US

(86) PCT/US2019/042604

(87) WO 2020/023312 2020.01.30

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

(72) Изобретатель:

Кумар Нареш (US)

(74) Представитель:

Парамонова К.В., Строкова О.В.,
Гизатуллин Ш.Ф., Гизатуллина
Е.М., Джермакян Р.В., Лебедев В.В.,
Христофоров А.А., Угрюмов В.М.,
Костюшенкова М.Ю., Лыу Т.Н. (RU)

(57) Данное изобретение относится к агонистическим антителам против CD226 человека, которые могут быть полезны для лечения солидных раковых опухолей.

202092895
A1

202092895

A1

АГОНИСТИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD226

Данное изобретение относится к области медицины. Более конкретно, данное изобретение относится к агонистическим антителам, направленным против человеческого CD226 (hCD226), композициям, содержащим такие агонистические антитела против человеческого CD226, и способам использования таких агонистических антител против человеческого CD226 для лечения рака.

Пути иммунных контрольных точек участвуют в подавлении или активации иммунного ответа (Isakov N, *J. Autoimmune Disorders* 2016; 2(2): 17). В терапии аутоиммунных заболеваний желательным является стимулирование, то есть агонизм, эффекта иммуноингибирующего пути, что приводит к подавлению иммунного ответа. И наоборот, при лечении рака может быть желательным стимулирование, т.е. агонизм, эффекта иммуностимулирующего пути, так что иммунный ответ активируется или стимулируется.

CD226 действует как иммунный костимуляторный рецептор (Dougall WC, et al., *Immunol. Rev.* 2017; 276: 112-120 (2017)). Таким образом, путь CD226 является иммуностимулирующим, т.е. он активирует/стимулирует иммунный ответ (Manaka, I, A, *J. Exp. Med.*; 2008; 205(13): 2959-2964; Van Vo, A, *Molecular Immunology*; 2016; 69: 70-76; Shengke, H, *J Biol Chem.*; 2014; 289(10): 6969-6977). Стимулирование (агонизм) иммуностимулирующего эффекта пути CD226 может быть полезным, например, при лечении рака, и терапевтическая молекула, которая способствует иммуностимулирующему эффекту пути CD226, является агонистом пути CD226.

CD226 экспрессируется на поверхности естественных киллеров (NK), тромбоцитов, моноцитов, CD8+ Т-клеток и активированных CD4+ Т-клеток (Van Vo, A, *Molecular Immunology*; 2016; 69: 70-76), а также при раке щитовидной железы, раке легких, раке желудка, колоректальном раке, раке головы и шеи, уротелиальном раке, раке простаты, раке яичников, раке эндометрия, раке шейки матки и меланоме (Protein Atlas, proteinatlas.org/ENSG00000150637-CD226/pathology).

CD226 взаимодействует с CD112 (PVRL2) и CD155 (PVR), которые широко экспрессируются на гематопозитических, эпителиальных и эндотелиальных клетках многих тканей человека и мыши (Van Vo, A, *Molecular Immunology*; 2016; 69: 70-76; Shengke, H, *J. of Biol. Chem.*, 2014; 289(10): 6969-6977). CD112 (PVRL2) экспрессируется при раке молочной железы, раке шейки матки, колоректальном раке, раке эндометрия, раке головы и шеи, раке печени, раке легких, меланоме, раке яичников, раке

поджелудочной железы, раке простаты, раке почки, раке желудка, раке яичек, раке щитовидной железы и уротелиальном раке. (Human Protein Atlas proteatlas.org/ENSG00000130202-NECTIN2/pathology). CD155 (PVR) экспрессируется при раке легких, раке печени, раке поджелудочной железы, карциноиде, колоректальном раке, раке головы и шеи, раке желудка, раке почки, уротелиальном раке, раке яичка, раке простаты, раке кожи и меланоме. (Human Protein Atlas, proteatlas.org/ENSG00000073008-PVR/pathology). CD155 также экспрессируется при саркоме мягких тканей (Atsumi S, *et al.*, *Oncol. Lett.* 2013; 5: 1771-1776).

Взаимодействие между CD226 на NK-клетках и Т-клетках и CD112 и CD155 на опухолевых клетках и антиген-презентирующих клетках усиливает клеточно-опосредованную цитотоксичность и продукцию цитокинов (Iguchi-Manaka, A, *J. Exp. Med.* 2008; 205(13): 2959-2964 *и ссылки в данном документе*). CD226 является частью пути CD226/TIGIT, в котором CD226 действует как иммуностимулирующий рецептор, а TIGIT действует как иммуносупрессивный рецептор, и CD226 конкурирует с TIGIT за связывание с CD155 и CD112 (Dougall WC, *et al.*, *Immunol. Rev.* 2017; 276: 112-120 (2017); Blake, S, *Clin Cancer Res*; 2016; 22(21): 5182-5188). TIGIT также ингибирует гомодимеризацию CD226, которая необходима для взаимодействия CD226/CD155 (Dougall WC, *et al.*, *Immunol. Rev.* 2017; 276: 112-120 (2017)).

Было высказано предположение, что агонизм иммуностимулирующего эффекта CD226 может быть полезным при лечении рака (Pauken, KE and EJ Wherry, *Cancer Cell* 2014; 26: 785-787;). Таким образом, усиление противоопухолевого иммунного ответа может быть эффективным средством лечения рака. CD226 может быть полезен для контроля функции NK-клеток и Т-клеток, и он участвует в стимуляции NK-клеток корецепторами адгезии и опосредованной CD8⁺ Т-клетками цитотоксичности против опухолевых клеток, формировании иммунологических синапсов, пролиферации и дифференцировке Т-клеток и секреции цитокинов. (Guillerey, C., *J. Clin. Investig.* 2015; 125(5): 2077-2089).

На мышях, лишенных CD226, было показано, что CD8⁺ Т-клеткам CD226 требуется для костимуляции при распознавании антигена, представленного непрофессиональными антигенпрезентирующими клетками, а NK-клеткам CD226 требуется для устранения опухолевых клеток, которые сравнительно устойчивы к опосредованной NK-клетками цитотоксичности, вызванной недостатком других лигандов, активирующих NK-клетки (Gilfillan, S., *J. Exp. Med.*; 2008; 205(13): 2965-2973). Таким образом, CD226 расширяет диапазон клеток-мишеней, которые могут активировать CD8⁺ Т-клетки и NK-клетки и, следовательно, может иметь важное значение для иммунного надзора против опухолей

и/или вирусов, которые ускользают от распознавания другими активирующими или вспомогательными молекулами (Gilfillan, S, *J. Exp. Med.*; 2008; 205(13): 2965-2973).

Сообщалось об отдельных антителах против CD226, таких как мышиный IgG1 KRA236 (Bottino, C, *Front Immunol.* 2014; 5: 56), крысиный IgG2a TX25 (Van Vo, A, *Molecular Immunology*; 2016; 69: 70-76); крысиный IgG2b 10e5 (Dardalhon, V.J *Immunol* 2005; 175:1558-1565); TX94, TX95, TX96, TX107 и мышиные TX108 (Okumura, G, *Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy*, 2017; 36(3): 135-139), 2E6 и 3B9 (Hou, S, *The J. Biol. Chemistry*; 2014; 289(10): 6969–6977), NewE1 (Gaud, G, *et al.*, *Sci. Signal.* 2018; 11: eaar3083; doi: 10.1126/scisignal.aar3083), DX11 (Bio-Rad MCA2257), 11A8 (BioLegend 338311) и LeoA1 (Millipore Sigma MABT398).

Однако не было сообщений о человеческих антителах к агонистам CD226 человека, и нет антител к CD226, находящихся в клинической разработке для лечения рака. Таким образом, существует потребность в антителах-агонистах, которые связываются с человеческим CD226, усиливают иммунный ответ и полезны при лечении рака.

Агонистические антитела против CD226 человека, описанные в данном документе, связываются с CD226 человека, стимулируют выработку ИФН-гамма Т-клетками и в качестве монотерапии подавляют рост опухоли на модели опухоли мышей. В одном варианте осуществления антитело по данному изобретению демонстрирует желаемую физическую и химическую стабильность, включая, но не ограничиваясь, стабильность *in vivo*, термостабильность, растворимость, низкую самоассоциацию и фармакокинетические характеристики, и, следовательно, оно потенциально полезно при лечении рака. В другом варианте осуществления агонистическое антитело против CD226 человека по данному изобретению является полностью человеческим антителом. В другом варианте осуществления агонистическое антитело против CD226 человека по данному изобретению представляет собой гуманизованное антитело.

В данном описании также предложено человеческое нуль-эффекторное IgG1-эффекторное антитело против CD226 человека (IgG1-EN), которое связывает человеческий CD226 (SEQ ID NO: 13) или его внеклеточный фрагмент (например, SEQ ID NO: 14) и ингибирует рост опухоли при монотерапии на моделях рака у мышей, антитело против CD226 человека, содержащее HCDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, HCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, HCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3, LCDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4, LCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 5 и LCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID №: 6. В другом варианте осуществления данное изобретение предусматривает, что антитело содержит

вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и вариабельную область легкой цепи (LCVR), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В другом варианте осуществления данное изобретение предусматривает, что антитело содержит тяжелую цепь (HC), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и легкую цепь (LC), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. В другом варианте осуществления данное изобретения предусматривает что антитело состоит из двух тяжелых цепей, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и двух легких цепей, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

В данном изобретении также предлагается клетка млекопитающего, способная экспрессировать антитело против CD226 человека, содержащее: HCDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, HCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, HCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3, LCDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4, LCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 5 и LCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6. В другом варианте осуществления данное изобретение предусматривает, что антитело против CD226 человека содержит HCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7 и LCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8. В другом варианте осуществления данное изобретение предусматривает, что антитело содержит тяжелую цепь (HC), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и легкую цепь (LC), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. В другом варианте осуществления данное изобретения предусматривает, что антитело состоит из двух тяжелых цепей, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и двух легких цепей, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

В данном изобретении также предлагается способ получения антитела против CD226 человека, включающий культивирование клетки млекопитающего, способной экспрессировать данное антитело, и выделение антитела, при этом антитело содержит HCDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, HCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, HCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3, LCDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4, LCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 5 и LCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6. В другом варианте осуществления данное изобретение предусматривает, что антитело включает HCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7 и LCVR с аминокислотной последовательностью SEQ

ID NO: 8. В другом варианте осуществления данное изобретение предусматривает, что антитело содержит тяжелую цепь (HC), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и легкую цепь (LC), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. В другом варианте осуществления данное изобретения предусматривает, что антитело состоит из двух тяжелых цепей, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и двух легких цепей, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. В данном изобретении также предлагается антитело против CD226 человека, полученное с помощью данного способа. В данном изобретении также предлагается фармацевтическая композиция, содержащая антитело против CD226 человека, полученное с помощью данного способа, а также приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

В данном изобретении также предлагается молекула ДНК, содержащая полинуклеотид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 11 и 12. В данном изобретении также предлагается клетка млекопитающего, содержащая молекулу ДНК, содержащую полинуклеотид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 11 и 12.

В данном изобретении также предлагается фармацевтическая композиция, включающая антитело против CD226 человека, содержащее: HCDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, HCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, HCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3, LCDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4, LCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 5 и LCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6 и приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество. В другом варианте осуществления данное изобретение предусматривает антитело против CD226 человека, содержащее HCVR, имеющее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и LCVR, имеющее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD226 человека содержит тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9 и легкую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD226 человека состоит из двух тяжелых цепей, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и двух легких цепей, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

В данном изобретении представлены способы лечения и способы применения. Была изучена роль CD226 как костимулирующего рецептора в иммунной системе. Например, мыши, дефицитные по CD226, показали значительно меньшую

цитотоксическую активность против опухолей, экспрессирующих лиганд CD226 *in vitro* по сравнению с клетками дикого типа (WT) (Iguchi-Manaka, A, *J. Exp. Med.* 2008; 205(13): 2959-2964). Таким образом, когда активируется путь CD226, активность иммунной системы усиливается, что может быть использовано при лечении рака путем стимуляции (агонизма) пути CD226, а агонистические антитела против CD226 человека могут оказывать терапевтический эффект против рака путем стимуляции активности NK-клеток и/или Т-клеток.

Экспрессия CD112 и/или CD155 задействована в различных солидных опухолях человека, включая колоректальную карциному (Masson, D., *Gut*, 2001; 49: 236-240; Tahara-Hanaoka, S. *Blood*, 2006; 107: 1491-1496); рак желудка (Tahara-Hanaoka, S., *Blood*, 2006; 107: 1491-1496); рак яичников (Carlsten, M., *Cancer Res.*, 2007; 67: 1317-1325); карциному поджелудочной железы (Nishiwada, *Anticancer Research*; 2015; 35: 2287-2298); и при карциноме предстательной железы, почечноклеточной карциноме, карциномах поджелудочной железы и толстой кишки, немелкоклеточной легочной карциноме, карциномах яичников и молочной железы (Sloan, K., *BMC Cancer* 2004; 4: 73).

Сверхэкспрессия CD155 в аденокарциномах легких была в значительной степени связана с метастазами в лимфатические узлы, уровнем бронхиолоальвеолярной карциномы, а выживаемость пациентов без признаков заболевания с положительной по CD155 сверхэкспрессией была значительно ниже, чем у пациентов с отрицательной сверхэкспрессией CD155 (Nakai, R, *Cancer Sci.*; 2010; 101(5): 1326–1330). Многофакторный анализ выживаемости показал, что экспрессия CD155 является независимым фактором риска неблагоприятного исхода (Nakai, R, *Cancer Sci.*; 2010; 101(5): 1326–1330).

В данном изобретении предложен способ лечения рака, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества антитела против CD226 человека, включающего: HCDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, HCDR2, с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, HCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3 и LCDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4, LCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 5 и LCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6. В другом варианте осуществления данное изобретение предусматривает, что антитело включает HCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7 и LCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8. В другом варианте осуществления данное изобретение также предусматривает, что антитело содержит HC с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9 и LC с аминокислотной последовательностью SEQ ID

NO: 10. В другом варианте осуществления данное изобретения предусматривает, что антитело состоит из двух тяжелых цепей, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и двух легких цепей, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления данное изобретение также предусматривает, что рак представляет собой солидную раковую опухоль. В другом варианте осуществления данное изобретение также предусматривает, что солидная раковая опухоль представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, колоректальный рак, рак эндометрия, рак головы и шеи, рак печени, рак легких, меланому, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак простаты, рак почки, саркому мягких тканей, рак желудка, рак яичка, рак щитовидной железы, рак матки или уротелиальный рак. В другом варианте осуществления рак легких представляет собой немелкоклеточный рак легких. В одном предпочтительном варианте реализации рак молочной железы представляет собой трижды негативный рак молочной железы.

В данном изобретении представлено антитело против CD226 человека, которое связывается с CD226 человека (SEQ ID NO: 13) или с его внеклеточным фрагментом (например, SEQ ID NO: 14), включающим HCDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, HCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, HCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3, LCDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4, LCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 5 и LCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6 для использования в терапии. В другом варианте осуществления данное изобретение предусматривает, что антитело включает HCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7 и LCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8. В другом варианте осуществления данное изобретение предусматривает, что антитело содержит HC с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9 и LC с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 10. В другом варианте осуществления данное изобретения предусматривает что антитело состоит из двух тяжелых цепей, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и двух легких цепей, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

В одном варианте осуществления терапия представляет собой лечение рака. В другом варианте осуществления данное изобретение предусматривает, что рак представляет собой солидную раковую опухоль. В другом варианте осуществления данное изобретение предусматривает, что солидная раковая опухоль представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, колоректальный рак, рак

эндометрия, рак головы и шеи, рак печени, рак легких, меланому, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак простаты, рак почек, саркому мягких тканей, рак желудка, рак яичка, рак щитовидной железы, рак матки или уротелиальный рак. В другом варианте осуществления рак легких представляет собой немелкоклеточный рак легких. В одном предпочтительном варианте осуществления рак молочной железы представляет собой трижды негативный рак молочной железы.

В данном изобретении представлено применение антитела против CD226 человека, которое связывается с CD226 человека (SEQ ID NO: 13) или с его внеклеточным фрагментом (например, SEQ ID NO: 14), включающим HCDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, HCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, HCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3, LCDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4, LCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 5 и LCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6 для изготовления препарата для лечения рака. В другом варианте осуществления данное изобретение предусматривает, что антитело включает HCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7 и LCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8. В другом варианте осуществления данное изобретение предусматривает, что антитело содержит HC, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и LC, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. В другом варианте осуществления данное изобретение предусматривает что антитело состоит из двух тяжелых цепей, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и двух легких цепей, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

В одном варианте осуществления данное изобретение также предусматривает, что рак представляет собой солидную раковую опухоль. В другом варианте осуществления данное изобретение также предусматривает, что солидная раковая опухоль представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, колоректальный рак, рак эндометрия, рак головы и шеи, рак печени, рак легких, меланому, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак простаты, рак почки, рак желудка, рак яичка, рак щитовидной железы, рак матки или уротелиальный рак. В другом варианте осуществления рак легких представляет собой немелкоклеточный рак легких. В одном предпочтительном варианте осуществления рак молочной железы представляет собой трижды негативный рак молочной железы.

В данном изобретении также предлагается человеческое агонистическое антитело против CD226 человека. В одном варианте осуществления человеческое антитело против

человека обладает противоопухолевым действием при введении *in vivo*. В данном изобретении предлагается клетка млекопитающего, способная экспрессировать человеческое антитело против человека. В данном изобретении также предлагается способ получения человеческого антитела против CD226 человека, включающий: культивирование клетки млекопитающего, способной экспрессировать антитело, и выделение антитела.

В данном изобретении также предлагается человеческое антитело против CD226 человека для применения в терапии. В одном варианте осуществления человеческое антитело против CD226 человека представляет собой агонистическое антитело. В другом варианте осуществления человеческое антитело против CD226 человека стимулирует иммунный ответ. В другом варианте осуществления человеческое антитело против CD226 человека обладает противоопухолевой активностью при введении *in vivo*.

В данном изобретении также предлагается человеческое антитело против CD226 человека для применения при лечении рака. В одном варианте осуществления данное изобретение предлагает человеческое агонистическое антитело против CD226 человека для применения при лечении солидного рака. В другом варианте осуществления антитело стимулирует иммунный ответ. В другом варианте осуществления антитело обладает противоопухолевой активностью при введении *in vivo*.

В одном варианте осуществления данное изобретение относится к человеческому антителу против CD226 человека для применения при лечении солидного рака. В другом варианте осуществления данное изобретение предусматривает, что солидная раковая опухоль представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, колоректальный рак, рак эндометрия, рак головы и шеи, рак печени, рак легких, меланому, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак простаты, рак почек, саркому мягких тканей, рак желудка, рак яичка, рак щитовидной железы, рак матки или уротелиальный рак. В другом варианте осуществления рак легких представляет собой немелкоклеточный рак легких. В одном предпочтительном варианте осуществления рак молочной железы представляет собой трижды негативный рак молочной железы.

В данном изобретении предлагается использование человеческого агонистического антитела против CD226 человека для изготовления препарата для лечения рака. В одном варианте осуществления данное изобретение предусматривает, что рак представляет собой солидную раковую опухоль. В другом варианте осуществления данное изобретение предусматривает, что солидная раковая опухоль представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, колоректальный рак, рак эндометрия, рак головы и шеи, рак печени, рак легких, меланому, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак

простаты, рак почки, саркому мягких тканей, рак желудка, рак яичка, рак щитовидной железы, рак матки или уротелиальный рак. В предпочтительном варианте осуществления рак легких представляет собой немелкоклеточный рак легких. В другом предпочтительном варианте осуществления рак молочной железы представляет собой трижды негативный рак молочной железы.

В одном варианте осуществления данного изобретения предложен способ лечения рака, включающий введение эффективного количества антитела, описанного в данном документе, в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с одним или большим количеством противоопухолевых агентов. Неограничивающие примеры противоопухолевых средств включают рамуцирумаб, нецитумумаб, оларатумаб, гемцитабин, пеметрексед, галунисертиб, абемациклиб, цисплатин, карбоплатин, дакарбазин, липосомальный доксорубицин, доцетаксел, циклофосфамид и доксорубицин, навельбин, эрибулин, частицы паклитаксела, связанные с белком, для инъекционной суспензии, иксабепилон, капецитабин, FOLFOX (лейковорин, фторурацил и оксалиплатин), FOLFIRI (лейковорин, фторурацил и иринотекан), цетуксимаб, ингибитор EGFR, ингибитор A-Raf, ингибитор B-Raf, ингибитор CDK4/6, ингибитор CDK7, ингибитор идолеамин-2,3-диоксигеназы, ингибитор TGF β , ингибитор рецептора TGF β , IL-10 и пегелированный IL-10 (например, пегилодекакин).

В одном варианте осуществления данного изобретения предложен способ лечения рака, включающий введение эффективного количества антитела, описанного в данном документе, в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с одним или несколькими иммуноонкологическими агентами. Неограничивающие примеры иммуноонкологических агентов включают ниволумаб, ипилимумаб, пидилизумаб, пембролизумаб, тремелиумаб, урелумаб, лирилумаб, атезолизумаб, дурвалумаб, анти-Tim3 антитело, анти-PD-1 антитело, анти-PD-L1 антитело и анти-PD-L1 антитело LY3300054 (последовательности тяжелой и легкой цепей которого описаны в WO 2017/034916 и US 2017/0058033 как, соответственно, SEQ ID NO: 10 и 11). В другом предпочтительном варианте осуществления иммуноонкологический агент представляет собой анти-PD-L1 антитело. В другом предпочтительном варианте осуществления анти-PD-L1 антитело представляет собой пембролизумаб.

В другом варианте осуществления антитело к CD226 включает: HCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7 и LCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8. В другом варианте осуществления в данном изобретении предложены клетка млекопитающего, способная экспрессировать антитело;

способ получения антитела, включающий культивирование клетки млекопитающего и выделение антитела; антитело, полученное указанным способом; и фармацевтическая композиция, содержащая антитело, и приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

В другом варианте осуществления антитело к CD226 содержит: HC, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и LC, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. В другом варианте осуществления в данном изобретении предложены клетка млекопитающего, способная экспрессировать антитело; способ получения антитела, включающий культивирование клетки млекопитающего и выделение антитела; антитело, полученное указанным способом; и фармацевтическая композиция, содержащая антитело, и приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

В другом варианте осуществления антитело против CD226 человека состоит из двух тяжелых цепей, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и двух легких цепей, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10. В другом варианте осуществления в данном изобретении также предложены клетка млекопитающего, способная экспрессировать антитело; способ получения антитела, включающий культивирование клетки млекопитающего и выделение антитела; антитело, полученное указанным способом; и фармацевтическая композиция, содержащая антитело и приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

В данном изобретении также предложена молекула ДНК, содержащая полинуклеотид, имеющий: последовательность SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 11 и 12.

В данном изобретении предложен способ лечения рака, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества антитела согласно данному изобретению.

Данное изобретение также относится к антителу, согласно данному изобретению, для применения в терапии. В одном варианте осуществления данное изобретение также предусматривает, что применение представляет собой лечение рака.

В данном изобретении предложено применение антитела, согласно данному изобретению, для изготовления препарата для лечения рака.

В одном варианте осуществления данное изобретение также предусматривает, что рак представляет собой солидный рак. В другом варианте осуществления солидная раковая опухоль представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, колоректальный рак, рак эндометрия, рак головы и шеи, рак печени, рак

легких, меланому, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак простаты, рак почки, саркому мягких тканей, рак желудка, рак яичка, рак щитовидной железы, рак матки или уротелиальный рак. В предпочтительном варианте осуществления рак легких представляет собой немелкоклеточный рак легких. В другом предпочтительном варианте осуществления рак молочной железы представляет собой трижды негативный рак молочной железы.

В одном предпочтительном варианте осуществления в данном изобретении предложено антитело против CD226 человека, которое связывается с CD226 человека и блокирует связывание CD226 с CD112, но не блокирует связывание с CD155.

В другом предпочтительном варианте осуществления в данном изобретении также предложено антитело против CD226 человека, которое проявляет функцию агониста, то есть стимулирует Т-клеточную в CD226⁺ Т-клетках, подвергнутых воздействию антитела против CD226 человека *in vitro*, например, повышая секрецию гамма-интерферона *in vitro* относительно уровня секреции гамма-интерферона *in vitro* CD226⁺ Т-клетками, которые не подвергаются воздействию антитела против CD226 человека. В одном варианте осуществления секрецию гамма-интерферона можно анализировать с использованием описанного здесь способа.

В другом предпочтительном варианте осуществления данное изобретение также относится к антителу против CD226 человека, которое проявляет функцию агониста, то есть индуцирует активацию репортерного гена NF-κB в клетках эмбриональной почки человека (НЕК), как описано в данном документе, по сравнению с клетками НЕК, которые не подвергаются действию антитела против CD226 человека *in vitro*, например, как описано в данном документе.

В другом предпочтительном варианте осуществления данное изобретение относится к антителу против CD226 человека, которое не активирует тромбоциты. В одном варианте осуществления анализ проводят с использованием проточной цитометрии для определения экспрессии р-селектина (CD62P) на поверхности тромбоцитов для определения статуса активации тромбоцитов.

В контексте данного документа, термин «антитело» относится к полипептидному комплексу, имеющему две тяжелые цепи (HC) и две легкие цепи (LC), так что тяжелые цепи и легкие цепи связаны между собой дисульфидными связями; причем антитело представляет собой антитело подкласса IgG. Каждая тяжелая цепь состоит из N-концевой варибельной области тяжелой цепи («HCVR») и константной области тяжелой цепи («HCCR»). Каждая легкая цепь состоит из N-концевой варибельной области легкой цепи («LCVR») и константной области легкой цепи («LCCR»). При экспрессии в определенных

биологических системах антитела, имеющие нативные последовательности Fc человека, гликозилируются в области Fc. Как правило, гликозилирование происходит в Fc области антитела в высококонсервативном участке N-гликозилирования. N-гликаны, как правило, присоединяются к аспарагину. Антитела могут быть также гликозилированы и в других положениях.

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

Области HCVR и LCVR могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность («CDR»), перемежающиеся с областями, которые являются более консервативными и называются каркасными областями («FR»). Каждая HCVR и LCVR состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца до карбокси-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В данном документе три CDR тяжелой цепи обозначены как «HCDR1, HCDR2 и HCDR3», а три CDR легкой цепи обозначены как «LCDR1, LCDR2 и LCDR3». CDR содержат большинство остатков, которые образуют специфические взаимодействия с антигеном.

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

Выделенная ДНК, кодирующая область LCVR, может быть преобразована в полноразмерный ген легкой цепи путем функционального соединения ДНК, кодирующей LCVR, с другой молекулой ДНК, кодирующей константную область легкой цепи. Последовательности генов константной области легкой цепи человека, а также других млекопитающих, известны в данной области техники. Фрагменты ДНК, охватывающие эти области, можно получить, например, с помощью стандартной ПЦР-амплификации. LCCR может быть каппа- или лямбда-константной областью. Предпочтительно для антител по данному изобретению константная область легкой цепи представляет собой константную область каппа.

Полинуклеотиды по данному изобретению могут быть экспрессированы в клетке-хозяине после функционального соединения указанных последовательностей с последовательностью контроля экспрессии. Экспрессионные векторы, как правило, пригодны для репликации в организмах-хозяевах либо в виде эписом, либо в виде неотъемлемой части хромосомной ДНК хозяина. Обычно, векторы экспрессии будут содержать маркеры отбора, например, тетрациклин, неомицин и дигидрофолатредуктазу, чтобы сделать возможным обнаружение этих клеток, трансформированных желаемыми последовательностями ДНК.

Антитела по данному изобретению можно легко получить в клетках млекопитающих, неограничивающие примеры которых включают клетки CHO, NS0, HEK 293 или COS. Клетки-хозяева культивируют, применяя технологии, хорошо известные в данной области техники.

Векторы, содержащие представляющие интерес полинуклеотидные последовательности (например, полинуклеотиды, кодирующие полипептиды антитела и последовательности контроля экспрессии), могут быть перенесены в клетку-хозяин хорошо известными способами, которые различаются в зависимости от типа клетки-хозяина.

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

В других вариантах осуществления данного изобретения антитело (или кодирующие его нуклеиновые кислоты) предлагаются в выделенной форме. В контексте данного документа, термин «выделенный» относится к белку, пептиду или нуклеиновой кислоте, которые не содержат или по существу не содержат любые другие виды макромолекул, обнаруживаемые в клеточной среде. В контексте данного документа, термин «по существу не содержит» означает, что представляющие интерес белок, пептид или нуклеиновая кислота содержат больше чем 80% (в мольном отношении) указанных видов макромолекул, предпочтительно больше чем 90% и более предпочтительно больше чем 95%.

Антитело по данному изобретению или содержащие его фармацевтические композиции можно вводить парентеральными путями, неограничивающими примерами которых являются подкожное введение и внутривенное введение. Антитело согласно данному изобретению может быть введено пациенту отдельно с фармацевтически приемлемыми носителями, разбавителями или вспомогательными веществами в виде

однократной или многократных доз. Фармацевтические композиции согласно данному изобретению могут быть получены способами, хорошо известными в данной области техники (например, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 22nd ed. (2012), A. Loyd et al., Pharmaceutical Press) и содержат антитело, как раскрыто в данном документе, и один или большее количество фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или вспомогательных веществ.

Используемый здесь термин «CD226» относится к рецептору, аминокислотная последовательность которого указана в SEQ ID NO: 13; uniprot.org/uniprot/Q15762. Пример конструкции внеклеточного домена CD226-His-тега можно найти на rndsystems.com, Продукт № Q154762.

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

Используемый здесь термин «агонистическое антитело против CD226 человека» относится к антителу, которое (а) связывается с CD226 человека (SEQ ID NO: 13) или с его внеклеточным фрагментом (например, SEQ ID NO: 14), (b) стимулирует иммунный ответ *in vitro*, например, по результатам анализа высвобождения Т-клеточных цитокинов (например, интерферона-гамма), как описано в данном документе, или *in vivo*, например, по результатам анализа высвобождения Т-клеточных цитокинов (например, интерферона-гамма) в крови или сыворотке субъекта и (с) при введении субъекту *in vivo* приводит к противоопухолевой активности.

В контексте моноклональных терапевтических антител термины «человек», «гуманизированный» и «полностью человеческий» хорошо известны специалистам в данной области техники (Weiner LJ, *J. Immunother.* 2006; 29: 1-9; Mallbris L, *et al.*, *J. Clin. Aesthet. Dermatol.* 2016; 9: 13-15).

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

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

Например, иммуностимулирующий эффект пути CD226 может быть опосредован ассоциацией с LFA-1 на поверхности клетки, которая усиливает активирующие сигналы. Участие LFA-1 приводит к опосредованному киназой Fyn фосфорилированию цитоплазматического домена CD226R (Marcus, A, *Adv Immunol.* 2014; 122: 91-128). В другом примере CD226 может также опосредовать активные биохимические сигналы, которые необходимы для его способности повышать цитотоксичность НК-клеток и продукцию цитокинов; эти сигналы инициируются консервативным ITT или ITT-

подобным мотивом (pYxNx), который подвергается фосфорилированию с помощью киназ семейства Src и рекрутирует адаптер Grb2. В свою очередь, Grb2 активирует Vav-1, PI3'K и PLC- γ 1, что приводит к активации потоков Erk, Akt и кальция. Такой путь способствует полимеризации актина и поляризации гранул, тем самым повышая цитотоксичность. Поскольку CD226 экспрессируется в других иммунных клетках, включая CD8⁺ Т-клетки, разумно предположить, что CD226 опосредует аналогичные сигналы и эффекты в этих клетках. (Zhang, Z, *JEM*, 2015; 212 (12): 2165).

Способы анализа активности CD226 *in vitro* известны рядовым специалистам в данной области, например, в Gaud, G, *et al.*, *Sci. Signal.* 2018; 11: eaar3083; doi: 10.1126/scisignal.aar3083.

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

Используемый в данном документе в отношении солидной опухоли термин «противораковая активность» относится к уменьшению размера опухоли; уменьшению прогрессирования рака у пациента от одной стадии к другой у пациентов, получавших лечение агонистическим антителом против CD226, по сравнению с пациентами, которых не лечили агонистическим антителом против CD226; или снижению частоты метастатического рака у пациентов, получавших лечение агонистическим антителом против CD226, по сравнению с пациентами, которых не лечили агонистическим антителом против CD226.

В контексте клинического лечения солидной раковой опухоли активацию (агонизм) иммуностимулирующего эффекта пути CD226 можно оценить путем изучения регрессии опухоли с использованием технологий, хорошо известных обычным специалистам в данной области, например, с использованием одного или большего количества рентгеновской визуализации, магнитно-резонансной томографии (МРТ), позитронно-эмиссионной томографии, ультразвуковой визуализации, биопсии ткани, биопсии опухоли, хирургического доступа и визуального осмотра, патологического анализа, иммуногистохимии, анализа биомаркеров в жидкостях или тканях организма, физического осмотра и пальпации.

Схемы введения могут быть скорректированы для обеспечения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического эффекта). Дозы лечения могут быть подобраны для оптимизации безопасности и эффективности. Графики дозирования для внутривенного (в/в) или не внутривенного введения, локализованного или системного введения или их комбинаций обычно будут варьироваться от однократной болюсной дозы или непрерывной инфузии до многократных введений в день (например, каждые 4-6 часов) или как указано лечащим врачом и обусловлено состоянием пациента. Количество и частота введения доз могут быть определены врачами, лечащими пациента.

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

«Эффективное количество» обозначает количество антитела согласно данному изобретению или фармацевтической композиции, содержащей антитело согласно данному изобретению, которое вызывает биологический или клинический ответ или необходимый терапевтический эффект в ткани, системе, организме животного, млекопитающего или человека, который предполагается исследователем, врачом или другим медицинским работником. Эффективное количество антитела может изменяться в зависимости от таких факторов, как состояние заболевания, возраст, пол и масса индивида, и способности антитела вызывать желаемый ответ у индивида. Эффективное количество также является таковым, при котором терапевтически полезные эффекты перевешивают любое токсичное или вредное воздействие антитела.

Эффективное количество может без труда установить специалист в данной области техники, используя известные технологии и наблюдая результаты, полученные при аналогичных обстоятельствах. При определении эффективного количества для пациентов лечащий врач-диагност учитывает множество факторов, включая, но не ограничиваясь ими: конституцию пациента; его массу, возраст и общее состояние здоровья; конкретное рассматриваемое заболевание или нарушение; степень или вовлечение в патологический процесс, или тяжесть заболевания или нарушения; ответ конкретного пациента; конкретное вводимое соединение; способ введения; характеристики биодоступности вводимого препарата; выбранную схему лечения; применение сопутствующего препарата и другие значимые обстоятельства.

В данном контексте термин «эффективный ответ» пациента или «ответ» пациента на лечение относится к клинической или терапевтической пользе, которую пациент получает при введении антитела по данному изобретению. Такое преимущество включает

любое одно или большее количество из следующего: увеличение выживаемости (включая общую выживаемость и выживаемость без прогрессирования); результат, приводящий к объективному ответу (включая полный или частичный ответ); стабилизированное заболевание; или улучшение признаков или симптомов рака и т. д.

Потенциальным преимуществом способов, описанных в данном документе, является возможность достижения выраженного и/или длительного противоопухолевого эффекта у пациента с приемлемым профилем безопасности, включающим приемлемую переносимость, уровень токсичности и/или нежелательных явлений, так что пациент получает пользу от способа лечения в целом. Эффективность лечения согласно данному изобретению может быть измерена с помощью различных конечных точек, обычно используемых при оценке лечения рака, включая, но не ограничиваясь, регрессию опухоли, уменьшение массы или размера опухоли, время до прогрессирования, общую выживаемость, выживаемость без прогрессирования, частоту общего ответа, продолжительность ответа и качество жизни.

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

Используемый здесь термин «полный ответ (ПО)» относится к исчезновению всех целевых поражений. Любые патологические лимфатические узлы (как целевые, так и нецелевые) должны иметь уменьшение по короткой оси до <10 мм. Результаты по маркерам опухолей должны быть нормализованы.

Используемый здесь термин «частичный ответ (ЧО)» означает уменьшение суммы диаметров целевых поражений по меньшей мере на 30%, принимая в качестве эталона исходные суммарные диаметры.

Используемый здесь термин «прогрессирующее заболевание (ПЗ)» означает увеличение суммы диаметров целевых поражений по меньшей мере на 20%, принимая в качестве эталона наименьшую сумму в исследовании (включая сумму на исходном уровне, если она наименьшая). Помимо относительного увеличения на 20%, сумма должна также демонстрировать абсолютное увеличение по меньшей мере на 5 мм. Появление 1 или большего количества новых поражений также считается прогрессированием. При неоднозначных признаках прогрессирования (например, очень маленькие и неопределенные новые поражения; кистозные изменения или некроз в существующих поражениях) лечение может продолжаться до следующей запланированной оценки. Если при следующей запланированной оценке прогрессирование подтверждается, датой прогрессирования должна быть более ранняя дата, когда подозревалось прогрессирование.

Используемый здесь термин «выживаемость без прогрессирования (ВБП)» определяется как время от даты приема первой дозы любого исследуемого препарата до даты радиологически задокументированного ПЗ или смерти по любой причине, в зависимости от того, что наступит раньше.

Используемый здесь термин «общая выживаемость (ОВ)» определяется как время от даты исследования первой дозы любого исследуемого препарата до даты смерти от любой причины.

В данном контексте термин «антитело 1» относится к антителу, имеющему аминокислотную последовательность HCDR1 SEQ ID NO: 1, аминокислотную последовательность HCDR2 SEQ ID NO: 2, аминокислотную последовательность HCDR3 SEQ ID NO: 3, аминокислотную последовательность LCDR1 SEQ ID NO: 4, аминокислотную последовательность LCDR2 SEQ ID NO: 5, аминокислотную последовательность LCDR3 SEQ ID NO: 6, аминокислотную последовательность HCVR SEQ ID NO: 7, аминокислотную последовательность LCVR SEQ ID NO: 8, аминокислотную последовательность HC SEQ ID NO: 9, аминокислотную последовательность LC SEQ ID NO: 10, последовательность ДНК HC SEQ ID NO: 11 и последовательность ДНК LC SEQ ID NO: 12.

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

Используемые здесь идентификаторы последовательностей перечислены в Таблице 1.

Таблица 1. Используемые здесь идентификаторы последовательностей	
SEQ ID NO: (Аминокислота)	Антитело 1
HCDR1	1
HCDR2	2
HCDR3	3
LCDR1	4
LCDR2	5
LCDR3	6

HCVR	7
LCVR	8
Тяжелая цепь	9
Легкая цепь	10
SEQ ID: (ДНК)	Антитело 1
HC	11
LC	12
CD226 человека (аминокислота): SEQ ID NO: 13	
CD226-ECD-Fc человека (аминокислота): SEQ ID NO: 14	

Определение характеристик, генерирование, экспрессия и очистка антитела

Продукция антитела с использованием полинуклеотидной последовательности HC, показанной в SEQ ID NO: 11, и полинуклеотидной последовательности LC, показанной в SEQ ID NO: 12, в клетках млекопитающих приводит к продукции полноразмерного антитела (далее именуемого «антитело 1»), имеющего аминокислотную последовательность HC, показанную в SEQ ID NO: 9, и аминокислотную последовательность LC SEQ ID NO: 10.

Антитела согласно данному изобретению могут быть сгенерированы с применением известных способов, включая, но не ограничиваясь фаговым дисплеем. Кроме того, антитела, полученные как описано выше, могут быть дополнительно подвергнуты скринингу с применением анализов, описанных в данном документе.

Полипептиды переменных областей HC и LC и полные аминокислотные последовательности HC и LC антитела 1, а также нуклеотидные последовательности, кодирующие их, перечислены в разделе «Аминокислотные и нуклеотидные последовательности».

Последовательность CD226 человека приведена в SEQ ID NO: 13, и последовательность слияния внеклеточного домена CD226 (ECD)-Fc человека приведена в SEQ ID NO: 14.

Антитела по данному изобретению, включая, но не ограничиваясь ими, антитело 1, можно изготовить и очистить, например, по существу следующим образом. Соответствующая клетка-хозяин, такая как НЕК 293 или СНО, может быть временно или стабильно трансфицирована экспрессионной системой для секреции антител, используя оптимальное предварительно определенное соотношение векторов НС:LC или единую векторную систему, кодирующую как НС, так и LC. Осветленная среда, в которую происходит секреция антитела, может быть очищена с помощью любой из многих обычно применяемых технологий. Например, среда может быть в целях удобства нанесена на колонку MabSelect (GE Healthcare) или колонку KappaSelect (GE Healthcare), уравновешенную совместимым буфером, таким как забуференный фосфатами физиологический раствор (рН 7,4). Колонка может быть промыта для удаления неспецифических связывающих компонентов. Связанное антитело может быть элюировано, например, градиентом рН (например, от 20 мМ Трис-буфера рН 7 до 10 мМ натрия цитратного буфера рН 3,0, или от забуференного фосфатами физиологического раствора рН 7,4 до 100 мМ глицинового буфера рН 3,0). Обнаружение фракций антител может быть проведено, например, с помощью УФ-поглощения или ДСН-ПААГ электрофореза, и затем проведено их объединение. Дополнительная очистка является необязательной и проводится в зависимости от предполагаемого применения. Антитело может быть сконцентрировано и/или стерильно отфильтровано, с применением обычных технологий. Растворимые агрегаты и мультимеры могут быть эффективно удалены с помощью обычных технологий, включая эксклюзионную хроматографию с гидрофобным взаимодействием, ионообменную, мультимодальную или гидроксипатитную хроматографию. Продукт может быть незамедлительно заморожен при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ или может быть лиофилизирован.

Антитело 1 связывается с CD226 человека

Способность антител, раскрытых в данном документе, связываться с CD226 человека может быть измерена с помощью ИФА. Для измерения связывания с CD226 человека 96-луночный планшет (Immulon 2НВ) покрывают CD226-Fc человека (R&D Systems) в течение ночи при 4°C . Лунки блокируют в течение 2 часов блокирующим буфером (PBS, содержащим 1% бычьего сывороточного альбумина). Лунки трижды промывают PBS, содержащим 0,1% Твин-20. Затем добавляют антитело 1 или контрольный IgG (100 мкл) в различных концентрациях и инкубируют при комнатной температуре в течение 1 часа. После промывания планшет инкубируют с 100 мкл конъюгата козьего антитела против человеческого IgG F(ab')₂-HRP (Jackson Immuno

Research Laboratories) при комнатной температуре в течение 45 минут. Планшеты промывают и затем инкубируют с 100 мкл 3,3', 5,5'-тетра-метилбензидина. Поглощение при 450 нм измеряют на считывающем устройстве для микропланшетов SpectraMax®. Полу максимальная эффективная концентрация (EC50) может быть рассчитана с применением программного обеспечения GraphPad Prism 7.

В экспериментах, проводимых по существу так же, как описано выше, антитело 1 связывает CD226 человека с EC50 0,1 нМ.

Антитело 1 связывается с CD226 яванского макака

Способность антител, описанных в данном документе, связываться с находящимся на клеточной поверхности CD226 яванского макака может быть измерена с применением проточной цитометрии. Стабильные клетки, экспрессирующие CD226 яванского макака, получают путем трансфекции ДНК плазмиды Суно-CD226 в клетки НЕК 293 (АТСС) человека с использованием реагента Fugene-6 (Promega) в соответствии с протоколом производителя. Стабильные клетки отбирают с применением 0,5 мкг/мл пурамицина в модифицированной Дульбеко среде Игла, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки и 1% GlutaMAX™. Для проточной цитометрии конфлюэнтные адгезивные клетки отделяют с использованием буфера для диссоциации клеток Gibco® (Life Technologies), промывают полной средой, затем ресуспендируют в буфере FACS (забуференный фосфатами физиологический раствор, содержащий 2,5% фетальной бычьей сыворотки + 1 мМ EDTA) и затем переносят в 96-луночный планшета с V-образным дном при плотности 5×10^4 клеток/луночку. Клетки окрашивают в течение 30 минут при комнатной температуре антителом 1 или контрольным IgG1 человека (приготовленным в буфере FACS, начиная с 100 мкг/мл и серийно разбавляют 1: 3 буфером FACS для, в целом, 7 концентраций).

После промывания в буфере FACS добавляют вторичное антитело - конъюгированное с аллофикоцианином (APC) козье антитело против IgG человека, специфичное к F(ab')₂ фрагменту (Jackson ImmunoResearch Laboratories) в разведении 1:200 и клетки инкубируют при комнатной температуре в течение 30 минут. Клетки промывают и ресуспендируют в буфере FACS. Раствор 7-аминоактиномицина D (7-AAD) (BD Biosciences) для окрашивания жизнеспособных клеток добавляют к каждому образцу непосредственно перед обработкой образцов на анализаторе клеток BD LSRFortessaX-20. Данные проточной цитометрии анализируют с применением программного обеспечения FlowJo®. Соотношение средней интенсивности флуоресценции (СИФ) рассчитывают как (СИФ экспериментального антитела)/(СИФ контрольного IgG).

В экспериментах, проводимых по существу как описано выше, антитело 1 в концентрации 0,14 мкг/мл демонстрирует более высокое соотношение СИФ - 2917,5 (11495/3,94).

Антитело 1 связывается с CD226 человека на поверхности клетки

Способность антител, описанных в данном документе, связываться с находящимся на клеточной поверхности CD226 человека может быть измерена с применением анализа проточной цитометрии. Стабильные клетки, экспрессирующие CD226 человека, получают путем трансфекции плазмидной ДНК CD226 человека в клетки НЕК 293 (ATCC) человека с использованием реагента Fugene-6 (Promega) в соответствии с протоколом производителя. Стабильные клетки отбирают с применением 0,5 мкг/мл пурамицина в модифицированной Дульбеко среде Игла, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки и 1% GlutaMAX™. Для проточной цитометрии конфлюэнтные адгезивные клетки отделяют с использованием буфера для диссоциации клеток Gibco® (Life Technologies), промывают полной средой, затем ресуспендируют в буфере FACS (забуференный фосфатами физиологический раствор, содержащий 2,5% фетальной бычьей сыворотки + 1 мМ EDTA) и затем переносят в 96-луночные планшеты с V-образным дном при плотности 5×10^4 клеток/луночку. Клетки окрашивают в течение 30 минут при комнатной температуре антителом 1 или контрольным человеческим IgG1 (приготовленным в буфере FACS, начиная со 100 мкг/мл и серийно разбавляют 1: 3 буфером FACS для, в целом, 10 концентраций).

После промывания в буфере FACS добавляют вторичное антитело - конъюгированное с аллофикоцианином (APC) козье антитело против IgG человека, специфичное к F(ab')₂ фрагменту (Jackson ImmunoResearch Laboratories) в разведении 1:200 и клетки инкубируют при комнатной температуре в течение 30 минут. Клетки промывают и ресуспендируют в буфере FACS. Раствор 7-аминоактиномицина D (7-AAD) (BD Biosciences) для окрашивания жизнеспособных клеток добавляют к каждому образцу непосредственно перед обработкой образцов на анализаторе клеток BD LSRFortessa X-20. Данные проточной цитометрии анализируют с применением программного обеспечения FlowJo®. Соотношение средней интенсивности флуоресценции (СИФ) рассчитывают как (СИФ экспериментального антитела)/(СИФ контрольного IgG).

В экспериментах, проводимых по существу как описано выше, антитело 1 в концентрации 0,14 мкг/мл демонстрирует более высокое соотношение СИФ - 850,78 (7640/8,98).

Результаты кинетики/аффинности для антитела 1

Прибор Biacore T200 может быть использован для измерения кинетики связывания иммобилизованного CD226-Fc человека с антителом 1. Рекомбинантный гибридный белок CD226-Fc человека (R&D Systems) ковалентно иммобилизован на сенсорном чипе CM5 посредством связывания по амино-группе (GE Healthcare). Исследование антитела к CD226 проводят при скорости потока 100 мкл/мин в буфере HBS-EP+. Образцы вводят в различных концентрациях, а измерения получают при 25°C. Поверхность регенерируют после каждого введения пробы при помощи 10 mM глицина-HCl с pH 2,1 при скорости потока 10 мкл/мин в течение 30 секунд, а затем стабилизируют буфером в течение 10 секунд. Сенсограммы концентраций в диапазоне от 1,95 до 1000 нМ оценивают с помощью программного обеспечения Biacore T200. Константа равновесной диссоциации (KD) или константа аффинности связывания рассчитывается из равновесного состояния. В экспериментах, проводимых по существу так, как описано выше, антитело 1 связывается с CD226 человека с константами кинетики и аффинности, приведенными в Таблице 2.

Таблица 2

К _д (нМ)	R _{max}	Chi ²
333,5±23,5	35±4,7	0,14±0,03

Анализ активности люциферазного репортера NF-каппа-B антитела 1

Способность антител, описанных в данном документе, активировать NF-каппа-B может быть измерена следующим образом. Двойная временная трансфекция плазмид репортера люциферазы NF-каппаB и pGL4.32[luc2P/NF-каппаB-RE/Hygro] в клетки НЕК 293 осуществляется плазмидными ДНК с использованием реагента Lipofectamine™ 2000 (Life Technologies) в соответствии с протоколом производителя в среде Игла, модифицированной Дульбекко, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки и 1% GlutaMAX™. Клетки культивируют в течение ночи при 37°C и клетки на следующий день распределяют на 96-луночном планшете. Антитело 1 или контрольный человеческий IgG1 разводят средой в отношении 1:3, всего 10 точек, и добавляют в планшет, начиная с 200 нМ. Затем клетки инкубируют с антителами в течение 18 ч при 37°C в 5% CO₂ и затем обрабатывают, используя люциферазную систему анализа ONE-Glo™ (Promega™). Люминесценцию измеряют с помощью ридера для микропланшетов

SpectraMax®. Полумаксимальная эффективная концентрация (EC50) может быть рассчитана с применением программного обеспечения GraphPad Prism 7.

В экспериментах, проводимых по существу так же, как описано выше, антитело 1 индуцирует опосредованный CD226 человека репортер NF-kB с EC50 4,11 нМ.

Антитело 1 способствует выработке Т-клетками интерферона-гамма

Способность антител, раскрытых в данном документе, стимулировать выработку интерферона-гамма (ИФН-гамма), продуцируемого Т-лимфоцитами, можно измерить следующим образом. Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) человека выделяют из цельной крови или лейкоконцентратов путем центрифугирования в градиенте плотности фиколла (Ficoll® Paque PLUS; GE Healthcare). CD8 Т-клетки выделяют из МКПК с использованием набора для выделения CD8 Т-клеток (Miltenyi) в соответствии с инструкциями производителя и ресуспендируют в среде X Vivo-15 (Lonza) в концентрации 0,75 миллиона на мл. Антитело 1 или контрольный человеческий IgG1 получают разбавлением в среде X Vivo-15 (Lonza) до 200 мкг/мл. Клон Hit3A антитела против CD3 человека (BD Biosciences) и клон CD28.2 антитела против CD28 человека (BioLegend) добавляют к суспензии CD8 Т-клеток в концентрации, соответственно, 10 мкг/мл и 2 мкг/мл. Клетки помещают в 96-луночный планшет с U-образным дном при 100 мкл на лунку, затем добавляют антитела в равном объеме и инкубируют в течение 96 ч при 37°C в увлажненном инкубаторе с 5% CO₂. Супернатанты собирают и уровни ИФН-гамма человека измеряют с применением набора ИФА для ИФН-гамма человека Quantikine® от R&D Systems®. Вкратце, супернатанты образцов и стандарты ИФН-гамма разбавляют в буфере для анализа и добавляют в планшеты, предварительно покрытые захватывающим антителом против ИФН-гамма и инкубируют в течение 2 ч при комнатной температуре. После промывания добавляют 200 мкл антител для обнаружения ИФН-гамма и инкубируют в течение 2 ч при комнатной температуре. После промывания планшеты проявляют путем добавления 200 мкл раствора субстрата в течение 10 минут с последующим добавлением 50 мкл стоп-раствора, и сигнал измеряют при 450 нм с помощью ридера для микропланшетов SpectraMax®. Анализ данных выполняется с применением программного обеспечения SoftMax Pro и GraphPad Prism (GraphPad Software).

В экспериментах, проводимых по существу так же, как описано выше, антитело 1 усиливает субоптимальную активацию МКПК человека путем костимуляции CD3/CD28, измеренную по продукции цитокина ИФН-гамма. В связи с этим обработка антителом 1

при 100 мкг/мл приводит к увеличению продукции ИФН-гамма в 1,6 раза по сравнению с контрольной обработкой IgG.

Противоопухолевая эффективность антитела 1 на модели развившейся опухоли

Линию опухолевых клеток человека немелкоклеточного рака легкого HCC827 (ATCC) поддерживают в соответствующих средах и собирают для имплантации. Опухолевые клетки (1×10^7 клеток на мышь) вводят подкожно в правый бок самкам мышей NOD/SCID Gamma (NSG) в возрасте 7 недель (Jackson Laboratories). Когда опухоли достигают примерно от 250 мм³ до 350 мм³ в размере, мышей рандомизируют в группы от 5 до 8 особей. Размноженные Т-лимфоциты человека получают путем стимуляции наивных МКПК человека гранулами Dynabeads® Human T-expander CD3/CD28 (Thermo Fisher Scientific) для размножения Т-лимфоцитов человека в течение 9-10 дней и сохраняют в репозитории клеток. МКПК человека (NY Blood Center) готовят центрифугированием на Ficoll® Paque PLUS в пробирках SepMate (STEMCELL Technologies) и сохраняют в репозитории клеток. Размноженные Т-лимфоциты оттаивают и $2,5 \times 10^6$ клеток вводят мышам. В качестве контроля, в некоторых мышей имплантируют только опухолевые клетки без Т-клеток. Обработка начинается в День 0 или День 1. Группы лечения включают контрольный IgG и антитело 1. Животным вводят 10 мг/кг антитела один раз в неделю в течение 4 недель путем внутрибрюшинной инъекции. Массу тела (МТ) регистрируют два раза в неделю, и процентное изменение МТ рассчитывают по формуле: $(\text{МТ в день наблюдения} - \text{МТ в первый день}) / \text{МТ в первый день} \times 100\%$. Объемы опухолей измеряют два раза в неделю с применением электронных штангенциркулей. Объем опухоли рассчитывают по формуле: $\text{объем опухоли (мм}^3\text{)} = \pi/6 * \text{длина} * \text{ширина}^2$. % Т/С рассчитывают по формуле $100 \times \Delta T / \Delta C$, если $\Delta T > 0$ средних геометрических значений. ΔT = средний объем опухоли в группе, получавшей препарат, в день наблюдения исследования - средний объем опухоли в группе, получавшей препарат, в начальный день введения дозы; ΔC = средний объем опухоли контрольной группы в день наблюдения исследования - средний объем опухоли контрольной группы в начальный день введения дозы. Статистический анализ данных об объеме опухоли выполняется с помощью двустороннего дисперсионного анализа с повторными измерениями по времени и лечению с использованием процедур MIXED в программном обеспечении SAS (версия 9,2).

В экспериментах, проводимых по существу так, как описано выше, мыши, получавшие антитело 1, демонстрировали значительное ингибирование роста опухоли (Т/С% = 56,7; $P < 0,01$).

Аминокислотные и нуклеотидные последовательности

SEQ ID NO: 1 (Антитело 1 HCDR1)

AASGFTFSSYYMS

SEQ ID NO: 2 (Антитело 1 HCDR2)

AISGSGGSTYYADSVKG

SEQ ID NO: 3 (Антитело 1 HCDR3)

ARDRWELHDAFDI

SEQ ID NO: 4 (Антитело 1 LCDR1)

RASQSISSYLN

SEQ ID NO: 5 (Антитело 1 LCDR2)

YRASTLQS

SEQ ID NO: 6 (Антитело 1 LCDR3)

QQSYSTPDT

SEQ ID NO: 7 (Антитело 1 HCVR)

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYYMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYARTAFDLWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 8 (Антитело 1 LCVR)

VIWMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPRLLIYRASTLQSGVPS
RFSGDGSGTHFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPDTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 9 (Антитело 1 HC)

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRWELHDAFDI WGQGMV
TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE
AEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP

REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

SEQ ID NO: 10 (Антитело 1 LC)

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSLGNWLAWYQQKPGKAPKLLIYQASTLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQHYKGSFWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYLSSTLTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 11 (ДНК антитела 1 HC)

gaggtgcagctgttgagctctgggggaggcttggtacagcctggggggtcctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttagcagctatgccatgagctgggtccgccaggctccaggaagggctggagtggtctcagctattagtgtagtggtgtagcacatactacgcagactccgtgaaggccggttcacatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacagggcgtatattactgtgcgagagatcgggtgggagcttcatgatgcttttgatatctggggccaagggacaatggtcaccgtctcttagcagtagcaccaggcccatcggtctccccctggcaccctcctcaagagcacctctgggggcacagcggccctgggctgcctgggtcaaggactactccccgaaccggtgacgggtgctggaactcaggcgcactgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtctcaggactctactccctcagcagcgtgggtgaccgtgccctccagcagcttgggcaccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaaaccaaggtggacaagagagttgagccaaatctgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcactgaagccgagggggcaccgtcagctctctcccccaaaaccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtccatgcgtgggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggatgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgaggaggagcagtacaacagcagcgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaagactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaagccctccatcctccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatccgggaggagatgaccaagaaccaagtcagcctgacctgctgggtcaaaaggcttctatcccagcagatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggaagaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttctctctattccaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacgcagaagagcctctccctgtctccgggcaaa

SEQ ID NO: 12 (ДНК антитела 1 LC)

gtcatctggatgaccagctccatcctcctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttcccgggcaagtccagagcattagcagctatattaaattggatcagcagaaaccagggaaagcccctaggctcctgatctaccgtgcatccactttacaaagtggggtcccatcaaggtcagtgggcagtgatctggaacacatttcaactctcaccatcagcagcctccagcctgaagatttgcaacttactactgtcaacagagttacgtacccccgacactttggccaggggaccaaggtggaaatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcaggtgaaatctggaactgcctctgtgtgctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccatcgggtaactcccaggagagtgatcagagcaggacagcaaggacagc

acctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcaagtcacccatcagggcct
gagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgt

SEQ ID NO: 13 (CD226 человека)

MDYPTLLLALLHVYRALC EEVLWHTSVPF AENMSLECVYPSMGILTQVEWFKIGTQQD
SIAIFSPTHGMVIRKPYAERVYFLNSTMASNNMTLFFRNASEDDVGYYSCLYTYYPQGT
WQKVIQVVQSDSFEAAVPSNSHIVSEPGKNVTLTCQPQMTWPVQAVRWEKIQPRQIDLL
TYCNLVHGRNFTSKFPRQIVSNCSHGRWSVIVIPDVTVSDSGLYRCYLQASAGENETFV
MRLTVAEGKTDN QYTLFVAGGTVLLLLFVISITTIIVIFLNRRRRRERRDLFTESWDTQK
APNNYRSPISTSQPTNQSMDDTREDIYVNYPTFSRRPKTRV

SEQ ID NO: 14 (CD226-Внеклеточный домен-Fc человека)

EEVLWHTSVPF AENMSLECVYPSMGILTQVEWFKIGTQQDSIAIFSPTHGMVIRKPYAER
VYFLNSTMASNNMTLFFRNASEDDVGYYSCLYTYYPQGTWQKVIQVVQSDSFEAAVPS
NSHIVSEPGKNVTLTCQPQMTWPVQAVRWEKIQPRQIDLLTYCNLVHGRNFTSKFPRQI
VSNCSHGRWSVIVIPDVTVSDSGLYRCYLQASAGENETFVMRLTVAEGKTDNHIEGRM
DPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWFYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело против CD226 человека, содержащее: HCDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, HCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, HCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3, LCDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4, LCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 5 и LCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6.
2. Антитело против CD226 человека по п. 1, содержащее переменную область тяжелой цепи (HCVR) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7 и переменную область легкой цепи (LCVR) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8.
3. Антитело против CD226 человека по п. 1, содержащее тяжелую цепь (HC) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9 и легкую цепь (LC) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 10.
4. Антитело против CD226 человека по п. 1, состоящее из двух тяжелых цепей, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 и двух легких цепей, имеющих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.
5. Антитело против CD226 человека по любому из пп. 1-4, отличающееся тем, что антитело является агонистическим антителом.
6. Клетка млекопитающего, способная экспрессировать антитело против CD226 человека по любому из пп. 1-5.
7. Способ получения антитела против CD226 человека, включающий культивирование клетки млекопитающего по п. 6 и выделение антитела.
8. Антитело против CD226 человека, полученное способом по п. 7.
9. Молекула ДНК, содержащая полинуклеотид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 11 и 12.
10. Клетка млекопитающего, содержащая молекулу ДНК по п. 9.
11. Способ получения антитела против CD226 человека, включающий культивирование клетки млекопитающего по п. 10 и выделение антитела.
12. Антитело против CD226 человека, полученное способом по п. 11.
13. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело против CD226 человека по любому из пп. 1-5, 8 и 12, и приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

14. Способ лечения солидной раковой опухоли, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества антитела против CD226 человека по любому из пп. 1-5, 8 и 12, причем солидная раковая опухоль представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, колоректальный рак, рак эндометрия, рак головы и шеи, рак печени, рак легких, меланому, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак простаты, рак почки, саркому мягких тканей, рак желудка, рак яичка, рак щитовидной железы, рак матки или уротелиальный рак.
15. Антитело против CD226 человека по любому из пп. 1-5, 8 и 12 для применения при лечении солидной раковой опухоли, причем солидная раковая опухоль представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, колоректальный рак, рак эндометрия, рак головы и шеи, рак печени, рак легких, меланому, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак простаты, рак почки, рак желудка, саркому мягких тканей, рак яичек, рак щитовидной железы, рак матки или уротелиальный рак.
16. Применение антитела против CD226 человека по любому из пп. 1-5, 8 и 12 для изготовления препарата для лечения солидной раковой опухоли, причем солидная раковая опухоль представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, колоректальный рак, рак эндометрия, рак головы и шеи, рак печени, рак легких, меланому, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак простаты, рак почки, рак желудка, саркому мягких тканей, рак яичка, рак щитовидной железы, рак матки или уротелиальный рак.
17. Агонистическое антитело против CD226 человека.
18. Клетка млекопитающего, способная экспрессировать антитело против CD226 человека по п. 17.
19. Способ получения антитела против CD226 человека, включающий: культивирование клетки млекопитающего, способной экспрессировать антитело по п. 17, и выделение антитела.
20. Агонистическое антитело против CD226 человека по п. 17 для применения в терапии.
21. Агонистическое антитело против CD226 человека для применения по п. 20 для применения в лечении рака.
22. Агонистическое антитело против CD226 человека по п. 21, отличающееся тем, что рак представляет собой солидный рак.
23. Агонистическое антитело против CD226 человека для применения по п. 22, отличающееся тем, что солидная раковая опухоль представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, колоректальный рак, рак эндометрия,

рак головы и шеи, рак печени, рак легких, меланому, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак простаты, рак почки, рак желудка, саркому мягких тканей, рак яичка, рак щитовидной железы, рак матки или уротелиальный рак.

24. Применение агонистического антитела против CD226 человека по п. 17 для изготовления препарата для лечения рака.
25. Применение по п. 24, отличающееся тем, что рак представляет собой солидный рак.
26. Применение по п. 25, отличающееся тем, что солидная раковая опухоль представляет собой рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак шейки матки, колоректальный рак, рак эндометрия, рак головы и шеи, рак печени, рак легких, меланому, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак простаты, рак почки, рак желудка, саркому мягких тканей, рак яичка, рак щитовидной железы, рак матки или уротелиальный рак.