

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202391843** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.11.22

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.02.09

(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD112R И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **63/148,149**

(32) **2021.02.11**

(33) **US**

(86) **PCT/IL2022/050162**

(87) **WO 2022/172267 2022.08.18**

(71) Заявитель:

**НЕКТИН ТЕРАПЬЮТИКС ЛТД.
(IL); ЮНИВЕРСИТИ ОФ РИЕКА
ФЭКАЛТИ ОФ МЕДИСИН (HR);
ИССУМ РИСЕРЧ ДИВЕЛОПМЕНТ
КОМПАНИ ОФ ТЕ ХИБРУ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ ДЖЕРУСАЛЕМ
ЛТД. (IL)**

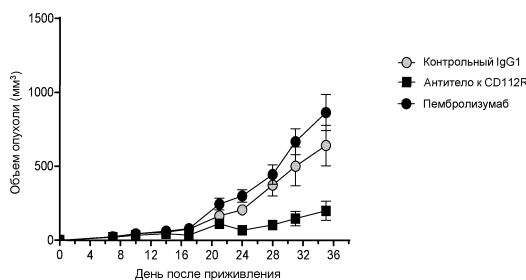
(72) Изобретатель:

**Цукерман Пинхас, Атиех Анас,
Обиедат Акрам, Цинамон Гай
(IL), Йонич Стипан, Ленац Ровиш
Тихана, Кучан Брлич Паола (HR),
Мандельбойм Офер (IL)**

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) Согласно настоящему изобретению предложены моноклональные антитела, которые распознают CD112R человека с высокой аффинностью и специфичностью, и ингибируют его связывание с нектином-2. Согласно настоящему изобретению также предложены фармацевтические композиции, содержащие указанные антитела, и способы их применения в иммунотерапии рака и в диагностике.



A1

202391843

202391843

A1

АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD112R И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение принадлежит к области иммунотерапии и относится к антителам и их фрагментам, которые связываются с белком CD112R (PVRIG) человека, к
5 полинуклеотидным последовательностям, кодирующим указанные антитела, и к клеткам, продуцирующим их. Также предложены фармацевтические композиции, содержащие указанные антитела, и варианты их применения.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Иммунотерапия рака используется для создания и усиления противоопухолевых
10 иммунных ответов, например, с помощью лечения антителами, специфичными в отношении антигенов на опухолевых клетках, с помощью содержащих химерные антигенные рецепторы Т-клеток (CAR-T) или с помощью специфичной активации противоопухолевых клеток. Способность привлекать иммунные клетки (например, Т-клетки или НК-клетки) против опухолевых клеток у пациента обеспечивает
15 терапевтический метод борьбы с опухолями и их метастазами, которые в прочих случаях считались неизлечимыми.

Опосредуемые Т-клетками иммунные ответы включают несколько последовательных этапов, регулируемых костимулирующими и коингибирующими сигналами, что приводит к суммарному эффекту, который контролирует величину
20 иммунного ответа и его результат. Ингибирующие сигналы, называемые иммунными контрольными точками, имеют решающее значение для поддержания аутоотолерантности и для ограничения опосредуемого иммунной системой сопутствующего повреждения тканей.

Экспрессия белков иммунных контрольных точек изменяется опухолями. Например,
25 положительная регуляция лиганда запрограммированной гибели клеток 1 (PD-L1) на поверхности раковых клеток позволяет им связываться с молекулой контрольной точки PD-1, экспрессируемой на Т-клетках. Это приводит к ингибированию Т-клеток, которые в ином случае могли бы атаковать опухолевые клетки, и, таким образом, позволяет раковым клеткам уклоняться от иммунной системы хозяина. Следовательно, иммунные
30 контрольные точки представляют собой значительные препятствия для активации функционального клеточного иммунитета против рака. Соответственно, антагонистические антитела, специфичные в отношении ингибирующих лигандов на Т-клетках (например, PD-1), представляют собой примеры нацеленных агентов против ингибиторов иммунных контрольных точек (ICI), которые используют в терапии рака
35 (например, ниволумаб, пембролизумаб). Другим примером молекулы иммунной

контрольной точки является Т-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и ITIM (TIGIT). TIGIT представляет собой коингибирующую молекулу, экспрессируемую на различных иммунных клетках, включая Т-клетки и клетки-естественные киллеры (NK-клетки). TIGIT связывается с высокой аффинностью с рецептором полиовируса (PVR, CD155) и с низкой аффинностью с нектином-2 (CD112), которые оба экспрессируются различными раковыми клетками.

CD112R, также называемый PVRIG, связывается с высокой аффинностью с нектином-2. После взаимодействия с CD112R, и/или TIGIT, нектин-2 ингибирует пролиферацию Т-клеток. Важно отметить, что нектин-2 также может служить кофактором функций Т-клеток после связывания с CD226 (DNAM-1). Это взаимодействие стимулирует пролиферацию Т-клеток и продукцию цитокинов, таких как IL-2 и IFN γ . Эти противоречивые взаимодействия являются конкурентными, и их суммарный эффект влияет на результирующий противораковый иммунный ответ.

В WO2019232484 раскрыто антитело к PVRIG, антитело к TIGIT и биспецифичное антитело к PVRIG/TIGIT, а также композиции и способы применения указанных антител для лечения рака.

В WO2018017864 раскрыты агенты и биспецифичные агенты, включая антитела, которые специфично связывают PVRIG. В WO2018017864 также раскрыты способы применения агентов для усиления иммунного ответа и/или лечения заболеваний, таких как рак.

В WO2016134333 раскрыты антитела к PVRIG и способы их применения.

Существует неудовлетворенная потребность в дополнительных и более эффективных, специфичных, безопасных и стабильных агентах, которые по отдельности или в комбинации с другими агентами могут стимулировать атаку опухолей или инфицированных вирусом клеток клетками иммунной системы. Такие агенты могут представлять собой моноклональные антитела (MAT), ингибирующие связывание CD112R с нектином-2.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Согласно настоящему изобретению предложены антитела и их фрагменты, которые распознают CD112R (PVRIG), связывают его, предотвращают его связывание с нектином-2 (CD112) и ингибируют результирующую супрессорную активность лимфоцитов, таких как клетки-естественные киллеры (NK) и Т-клетки. Указанные антитела и их фрагмент характеризуются наличием уникальных наборов последовательностей определяющих комплементарность участков (CDR), высокой аффинностью и высокой специфичностью в отношении CD112R человека, и пригодны для иммунотерапии рака для борьбы с

уклонением опухоли от иммунной системы либо в качестве самостоятельной терапии, либо в комбинации с другими противораковыми агентами. Антитела, раскрытые в настоящей заявке, также могут быть пригодны в лечении вирусных инфекций и могут применяться для анализов с целью детектирования и диагностики рака.

5 В настоящей заявке раскрыто, что высокоаффинные моноклональные антитела (МАТ) к CD112R, описанные в настоящей заявке, блокируют взаимодействия CD112R-нектин-2, а затем восстанавливают активность Т-клеток и NK-клеток. Эти свойства делают МАТ согласно настоящему изобретению значимыми кандидатами для применения в противораковой иммунотерапии, что позволяет вводить более низкие дозы с меньшим
10 количеством побочных эффектов.

Было обнаружено, что МАТ к CD112R, описанные в настоящей заявке, индуцируют активацию Т-клеток путем, который сходен с тем, который индуцируют МАТ к PD-1, МАТ к TIGIT и МАТ к PVR. Кроме того, комбинация некоторых МАТ к CD112R, описанных в настоящей заявке, с другими иммуномодулирующими агентами, включая
15 МАТ к PD-1, МАТ к TIGIT или МАТ к PVR, приводила к значительному увеличению противораковой активности, которое превышало уровень активности, индуцированный каждым отдельным МАТ. МАТ к CD112R, раскрытые в настоящей заявке, были способны индуцировать активацию NK-клеток в присутствии раковых клеток-мишеней и действовать синергически с МАТ к TIGIT и МАТ к PVR для активации NK-клеток. Также
20 раскрыто, что антитела, описанные в настоящей заявке, как обнаружено, обладают высокой специфичностью в отношении CD112R человека и яванской макаки, но не в отношении CD112R грызунов. В соответствии с некоторыми вариантами реализации также раскрыто, что МАТ к CD112R блокируют взаимодействия CD112R с его лигандом нектином-2 и повышают активацию иммунных клеток.

25 Неожиданно было обнаружено, что гуманизированные формы МАТ к CD112R согласно настоящему изобретению обладают улучшенными свойствами связывания и продуктивности по сравнению с исходными мышиными МАТ. Кроме того, гуманизированные варианты МАТ обладают перекрестной реактивностью с CD112R яванской макаки, что позволяет проводить дальнейшие исследования на обезьянах.
30 Антитела, описанные в настоящей заявке, обладают уникальными свойствами и улучшенной эффективностью по сравнению с известными антителами к CD112R.

Неожиданно и предпочтительно, конкретные мутации в определяющем комплементарность участке 1 (CDR1) легкой цепи и в CDR1 тяжелой цепи, введенные для удаления мотивов дезамидирования и N-гликозилирования, соответственно, сохраняли
35 аффинность в отношении CD112R человека.

В соответствии с одним аспектом настоящего изобретения предложено антитело или фрагмент указанного антитела, содержащий по меньшей мере антигенсвязывающую часть, которые специфично связываются с CD112R человека, причем указанное антитело или его фрагмент обладают аффинностью в отношении CD112R человека, составляющей по меньшей мере $0,5 \times 10^{-9}$ M.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации антитело специфично связывается с CD112R человека и ингибирует его связывание с его лигандом, нектином-2 человека (CD112).

В соответствии с некоторыми вариантами реализации антитело или фрагмент антитела содержит набор из шести последовательностей CDR, выбранных из группы, состоящей из:

i. трех CDR вариабельной области тяжелой цепи (HC), содержащей SEQ ID NO: 17, и трех CDR вариабельной области легкой цепи (LC), содержащей SEQ ID NO: 19, или их аналог или производное, имеющее по меньшей мере 90% идентичности последовательности с указанной последовательностью антитела или фрагмента; и

ii. трех CDR вариабельной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 21, и трех CDR вариабельной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 23, или их аналог или производное, имеющее по меньшей мере 90% идентичности последовательности с указанной последовательностью антитела или фрагмента.

Существует несколько методов определения последовательностей CDR конкретной молекулы антитела, известных в данной области техники, однако не существует стандартного однозначного метода. Определение последовательностей CDR из вариабельных областей тяжелой и легкой цепи антитела может быть выполнено любым методом, известным в данной области техники, включая, но не ограничиваясь перечисленным, методы, известные как KABAT, Chothia и IMGT. Отобранный набор CDR может включать последовательности, идентифицированные более чем одним методом, а именно некоторые последовательности CDR могут быть определены с использованием KABAT, а некоторые – с использованием IMGT, например. В соответствии с некоторыми вариантами реализации последовательности CDR вариабельных областей MAT определены с использованием методов KABAT и/или Chothia.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации антитело или его фрагмент содержат последовательности CDR моноклонального антитела, обозначенного как клон 13, а именно три последовательности CDR, содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 17, и три последовательности CDR,

содержащиеся в вариабельной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 19, или последовательности CDR моноклонального антитела, обозначенного как клон 15, а именно три последовательности CDR, содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 21, и три последовательности CDR, содержащиеся в вариабельной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 23.

Настоящее изобретение включает варианты и аналоги антитела, обозначенного как клон 13. В соответствии с некоторыми вариантами реализации антитело или фрагмент антитела содержит набор из трех последовательностей CDR вариабельной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 28, и трех CDR вариабельной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 26, или их аналог или производное, имеющее по меньшей мере 90% идентичности последовательности с указанной последовательностью антитела или фрагмента.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации антитело или фрагмент антитела содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащий последовательность GYX₁FX₂SY (SEQ ID NO: 1), где X₁ обозначает N, D, A, Q, S или T; и X₂ обозначает T или A, или последовательность SYWIN (SEQ ID NO: 7). В соответствии с некоторыми вариантами реализации антитело или фрагмент антитела содержит CDR2 тяжелой цепи, содержащий последовательность YPGSYIP (SEQ ID NO: 2). В соответствии с некоторыми вариантами реализации антитело или фрагмент антитела содержит CDR3 тяжелой цепи, содержащий последовательность GYFDV (SEQ ID NO: 3).

В соответствии с определенными вариантами реализации антитело или фрагмент антитела содержит: (i) CDR1 тяжелой цепи, содержащий последовательность GYX₁FX₂SY (SEQ ID NO: 1), где X₁ обозначает N, D, A, Q, S или T; и X₂ обозначает T или A, или последовательность SYWIN (SEQ ID NO: 7); (ii) CDR2 тяжелой цепи, содержащий последовательность YPGSYIP (SEQ ID NO: 2); и (iii) CDR3 тяжелой цепи, содержащий последовательность GYFDV (SEQ ID NO: 3).

В соответствии с некоторыми вариантами реализации антитело или фрагмент антитела содержит CDR1 легкой цепи, содержащий последовательность KSSQSLLXSGNQKNYLA (SEQ ID NO: 4), где X обозначает N или S. В соответствии с некоторыми вариантами реализации антитело или фрагмент антитела содержит CDR2 легкой цепи, содержащий последовательность GASTRES (SEQ ID NO: 5). В соответствии с некоторыми вариантами реализации антитело или фрагмент антитела содержит CDR3 легкой цепи, содержащий последовательность QNDHSYPYT (SEQ ID NO: 6).

В соответствии с определенными вариантами реализации антитело или фрагмент антитела содержит: (i) CDR1 легкой цепи, содержащий последовательность

KSSQSLLXSGNQKNYLA (SEQ ID NO: 4), где X обозначает N или S; (ii) CDR2 легкой цепи, содержащий последовательность GASTRES (SEQ ID NO: 5); и (iii) CDR3 тяжелой цепи, содержащий последовательность QNDHSYPYT (SEQ ID NO: 6).

В соответствии с некоторыми конкретными вариантами реализации антитело или фрагмент содержит последовательность CDR1 тяжелой цепи, содержащую последовательность GYX₁FX₂SY (SEQ ID NO: 1), где X₁ обозначает N, D, A, Q, S или T; и X₂ обозначает T или A, или последовательность SYWIN (SEQ ID NO: 7), CDR2 тяжелой цепи, содержащий последовательность YPGSYIP (SEQ ID NO: 2), CDR3 тяжелой цепи, содержащий последовательность GYFDV (SEQ ID NO: 3), CDR1 легкой цепи, содержащий последовательность KSSQSLLXSGNQKNYLA (SEQ ID NO: 4), где X обозначает N или S, CDR2 легкой цепи, содержащий последовательность GASTRES (SEQ ID NO: 5), и CDR3 легкой цепи, содержащий последовательность QNDHSYPYT (SEQ ID NO: 6), или их аналоги, содержащие не более 5% аминокислотных замен, делеций и/или инсерций в последовательности гипервариабельной области (HVR), которая содержит шесть CDR.

В соответствии с некоторыми конкретными вариантами реализации антитело или фрагмент содержит набор из шести последовательностей CDR, состоящий из:

- i. CDR1 тяжелой цепи, имеющего последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 или 7;
- ii. CDR2 тяжелой цепи, имеющего последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2;
- iii. CDR3 тяжелой цепи, имеющего последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3;
- iv. CDR1 легкой цепи, имеющего последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4;
- v. CDR2 легкой цепи, имеющего последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5; и
- vi. CDR3 легкой цепи, имеющего последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации последовательность CDR1 тяжелой цепи содержит последовательность GYX₁FX₂SY (SEQ ID NO: 1), где X₁ обозначает N, D, A, Q, S или T; и X₂ представляет собой T или A. В соответствии с некоторыми вариантами реализации последовательность CDR1 тяжелой цепи содержит последовательность GYX₁FX₂SY (SEQ ID NO: 1), где X₁ обозначает N, D, A, Q, S или T, и X₂ представляет собой T. В соответствии с некоторыми вариантами реализации

последовательность CDR1 тяжелой цепи содержит последовательность GYTFTSY (SEQ ID NO: 13). В соответствии с дополнительными вариантами реализации последовательность CDR1 тяжелой цепи содержит последовательность GYNFASY (SEQ ID NO: 14). В соответствии с дополнительными вариантами реализации последовательность CDR1 тяжелой цепи содержит последовательность SYWIN (SEQ ID NO: 7).

В соответствии с некоторыми вариантами реализации последовательность CDR2 тяжелой цепи содержит последовательность YPGSYIP (SEQ ID NO: 2) или DIYPGSYIPNYNEKFKN (SEQ ID NO: 8). В соответствии с определенными вариантами реализации последовательность CDR2 тяжелой цепи содержит последовательность DIYPGSYIPNYNEKFKN (SEQ ID NO: 8).

В соответствии с некоторыми вариантами реализации последовательность CDR1 легкой цепи содержит последовательность KSSQSLLXSGNQKNYLA (SEQ ID NO: 4), где X представляет собой N. В соответствии с конкретными вариантами реализации последовательность CDR1 легкой цепи содержит последовательность KSSQSLLSSGNQKNYLA (SEQ ID NO: 15).

В соответствии с некоторыми вариантами реализации антитело или его фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 28, или ее аналог или производное, имеющее по меньшей мере 90% идентичности последовательности с указанной последовательностью вариабельной области тяжелой цепи.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации антитело или его фрагмент содержит вариабельную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 26, или ее аналог, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с указанной последовательностью вариабельной области легкой цепи.

В соответствии с конкретным вариантом реализации антитело или его фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 28, и вариабельную область легкой цепи, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26, или ее аналог, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с указанной последовательностью легкой и/или тяжелой цепи.

В соответствии с конкретным вариантом реализации антитело или его фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17, и вариабельную область легкой цепи, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19, или ее аналог, имеющий по

меньшей мере 90% идентичности последовательности с указанной последовательностью легкой и/или тяжелой цепи.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации антитело или фрагмент содержит последовательности CDR моноклонального антитела, обозначенного как клон 13, а именно три последовательности CDR, содержащиеся в варибельной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 17, и три последовательности CDR, содержащиеся в варибельной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 19.

В соответствии с дополнительными вариантами реализации антитело или фрагмент антитела содержит CDR1 тяжелой цепи, содержащий последовательность GYNFTSY (SEQ ID NO: 9) или SYWIN (SEQ ID NO: 7). В соответствии с некоторыми вариантами реализации антитело или фрагмент антитела содержит CDR2 тяжелой цепи, содержащий последовательность FPGSYS (SEQ ID NO: 10). В соответствии с некоторыми вариантами реализации антитело или фрагмент антитела содержит CDR3 тяжелой цепи, содержащий последовательность GYFDV (SEQ ID NO: 3).

В соответствии с определенными вариантами реализации антитело или фрагмент антитела содержит: (i) CDR1 тяжелой цепи, содержащий последовательность GYNFTSY (SEQ ID NO: 9) или SYWIN (SEQ ID NO: 7); (ii) CDR2 тяжелой цепи, содержащий последовательность FPGSYS (SEQ ID NO: 10); и (iii) CDR3 тяжелой цепи, содержащий последовательность GYFDV (SEQ ID NO: 3).

В соответствии с некоторыми вариантами реализации антитело или фрагмент антитела содержит CDR1 легкой цепи, содержащий последовательность KSSQSLLNSGSQKNYLA (SEQ ID NO: 11). В соответствии с некоторыми вариантами реализации антитело или фрагмент антитела содержит CDR2 легкой цепи, содержащий последовательность GASTRES (SEQ ID NO: 5). В соответствии с некоторыми вариантами реализации антитело или фрагмент антитела содержит CDR3 легкой цепи, содержащий последовательность QNDHSYPYT (SEQ ID NO: 6).

В соответствии с определенными вариантами реализации антитело или фрагмент антитела содержит: (i) CDR1 легкой цепи, содержащий последовательность KSSQSLLNSGSQKNYLA (SEQ ID NO: 11); (ii) CDR2 легкой цепи, содержащий последовательность GASTRES (SEQ ID NO: 5); и (iii) CDR3 тяжелой цепи, содержащий последовательность QNDHSYPYT (SEQ ID NO: 6).

В соответствии с некоторыми конкретными вариантами реализации антитело или фрагмент содержит последовательность CDR1 тяжелой цепи, содержащую последовательность GYNFTSY (SEQ ID NO: 9) или SYWIN (SEQ ID NO: 7), CDR2 тяжелой цепи, содержащий последовательность FPGSYS (SEQ ID NO: 10), CDR3 тяжелой

цепи, содержащий последовательность GYFDV (SEQ ID NO: 3), CDR1 легкой цепи, содержащий последовательность KSSQSLLNSGSQKNYLA (SEQ ID NO: 11), CDR2 легкой цепи, содержащий последовательность GASTRES (SEQ ID NO: 5), и CDR3 легкой цепи, содержащий последовательность QNDHSYPYT (SEQ ID NO: 6), или их аналоги, содержащие не более 5% аминокислотных замен, делеций и/или инсерций в последовательности гипервариабельной области (HVR).

В соответствии с некоторыми конкретными вариантами реализации антитело или фрагмент содержит набор из шести последовательностей CDR, состоящий из:

- i. CDR1 тяжелой цепи, имеющего последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9 или 7;
- ii. CDR2 тяжелой цепи, имеющего последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10;
- iii. CDR3 тяжелой цепи, имеющего последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3;
- iv. CDR1 легкой цепи, имеющего последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11;
- v. CDR2 легкой цепи, имеющего последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5; и
- vi. CDR3 легкой цепи, имеющего последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации последовательность CDR1 легкой цепи содержит последовательность GYNFTSY (SEQ ID NO: 9). В соответствии с другими вариантами реализации последовательность CDR1 легкой цепи содержит последовательность SYWIN (SEQ ID NO: 7).

В соответствии с некоторыми вариантами реализации последовательность CDR2 тяжелой цепи содержит последовательность DIFPGSYSPNYNKKFKR (SEQ ID NO: 12).

В соответствии с некоторыми вариантами реализации CDR определены по Kabat и представлены в SEQ ID NO: 7, 8, 3, 4, 5 и 6. В соответствии с некоторыми вариантами реализации CDR определены по Kabat и представлены в SEQ ID NO: 7, 12, 3, 11, 5 и 6.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации CDR определены по Chothia и представлены в SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 и 6. В соответствии с некоторыми вариантами реализации CDR определены по Chothia и представлены в SEQ ID NO: 9, 10, 3, 11, 5 и 6.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации антитело или его фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 21, или ее аналог или производное, имеющее по меньшей мере 90% идентичности

последовательности с указанной последовательностью вариабельной области тяжелой цепи.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации антитело или его фрагмент содержит вариабельную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 23, или ее
5 аналог, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с указанной последовательностью вариабельной области легкой цепи.

В соответствии с конкретным вариантом реализации антитело или его фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, и вариабельную область легкой цепи, имеющую
10 последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23, или ее аналог, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с указанной последовательностью легкой и/или тяжелой цепи.

В соответствии с конкретным вариантом реализации антитело или его фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, и вариабельную область легкой цепи, имеющую
15 последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации антитело или его фрагмент распознает CD112R человека с аффинностью по меньшей мере 10^{-10} М. В соответствии с другими вариантами реализации антитело или фрагмент антитела связывается с CD112R
20 человека с аффинностью 5×10^{-11} М или даже выше. В соответствии с некоторыми вариантами реализации антитело или фрагмент антитела связывается с CD112R человека с аффинностью в диапазоне от $0,5 \times 10^{-9}$ М до 10^{-11} М. В соответствии с некоторыми вариантами реализации антитело или фрагмент антитела связывается с CD112R человека с аффинностью в диапазоне от 10^{-10} М до 10^{-11} М. Каждый возможный вариант представляет
25 собой отдельный вариант реализации настоящего изобретения.

Аналоги и производные антитела и фрагментов, описанных выше, также включены в объем настоящего изобретения.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации аналог антитела или фрагмента антитела имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности с
30 гипервариабельной областью последовательности референсного антитела.

В соответствии с определенными вариантами реализации аналог или производное выделенного антитела или его фрагмента имеет по меньшей мере 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности последовательности с вариабельной областью последовательности референсного антитела. Каждый возможный вариант представляет
35 собой отдельный вариант реализации настоящего изобретения.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации антитело или фрагмент антитела в соответствии с настоящим изобретением содержит переменную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 28 или SEQ ID NO: 21, или аналог, имеющий по меньшей мере 95% сходства последовательности с указанной последовательностью.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации антитело или фрагмент антитела содержит переменную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 26 или SEQ ID NO: 23, или аналог, имеющий по меньшей мере 95% сходства последовательности с указанной последовательностью.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации антитело или фрагмент антитела содержит тяжелую цепь и легкую цепь, причем: (i) тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 28, и легкая цепь содержит SEQ ID NO: 26; или (ii) тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 21, и легкая цепь содержит SEQ ID NO: 23. Также включены аналоги антител или фрагментов, имеющие по меньшей мере 95% сходства последовательности с указанными тяжелыми или легкими цепями.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации аналог имеет по меньшей мере 96, 97, 98 или 99% сходства или идентичности последовательности с переменными областями легкой или тяжелой цепи антитела, описанными выше. В соответствии с некоторыми вариантами реализации аналог содержит не более одной аминокислотной замены, делеции или добавления к одной или более последовательностям CDR гиперпеременной области, а именно любой из последовательностей CDR, представленных в SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 и 15. Каждый возможный вариант представляет собой отдельный вариант реализации настоящего изобретения. В соответствии с некоторыми вариантами реализации аминокислотная замена представляет собой консервативную замену.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации антитело или фрагмент антитела содержит гиперпеременную область (HVR), имеющую области легкой и тяжелой цепи, определенные выше, в которой 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот были заменены, удалены и/или добавлены. Каждый возможный вариант представляет собой отдельный вариант реализации настоящего изобретения.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации антитело или фрагмент антитела содержит HVR, имеющую области легкой и тяжелой цепи, определенные выше, в которой была заменена одна аминокислота. В соответствии с конкретными вариантами реализации антитело или фрагмент антитела содержит CDR, определенную выше, в которой была заменена одна аминокислота.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации антитело или фрагмент антитела содержит набор CDR, выбранный из группы, состоящей из:

i. набора из шести CDR, причем: CDR1 тяжелой цепи представляет собой GYX₁FX₂SY (SEQ ID NO: 1), где X₁ обозначает N, D, A, Q, S или T; и X₂ обозначает T или A; CDR2 тяжелой цепи представляет собой YPGSYIP (SEQ ID NO: 2); CDR3 тяжелой цепи представляет собой GYFDV (SEQ ID NO: 3); CDR1 легкой цепи представляет собой KSSQSLLXSGNQKNYLA (SEQ ID NO: 4), где X обозначает N или S; CDR2 легкой цепи представляет собой GASTRES (SEQ ID NO: 5); и CDR3 легкой цепи представляет собой QNDHSYPYT (SEQ ID NO: 6);

ii. набора из шести CDR, причем: CDR1 тяжелой цепи представляет собой SYWIN (SEQ ID NO: 7); CDR2 тяжелой цепи представляет собой YPGSYIP (SEQ ID NO: 2); CDR3 тяжелой цепи представляет собой GYFDV (SEQ ID NO: 3); CDR1 легкой цепи представляет собой KSSQSLLXSGNQKNYLA (SEQ ID NO: 4), где X обозначает N или S; CDR2 легкой цепи представляет собой GASTRES (SEQ ID NO: 5); и CDR3 легкой цепи представляет собой QNDHSYPYT (SEQ ID NO: 6); и

iii. набора из шести CDR, причем: последовательность CDR1 тяжелой цепи представляет собой GYNFTSY (SEQ ID NO: 9) или SYWIN (SEQ ID NO: 7); CDR2 тяжелой цепи представляет собой FPGSYS (SEQ ID NO: 10); CDR3 тяжелой цепи представляет собой GYFDV (SEQ ID NO: 3); CDR1 легкой цепи представляет собой KSSQSLLNSGSQKNYLA (SEQ ID NO: 11); CDR2 легкой цепи представляет собой GASTRES (SEQ ID NO: 5); и CDR3 легкой цепи представляет собой QNDHSYPYT (SEQ ID NO: 6).

Согласно настоящему изобретению также предложены антитела и их связывающие фрагменты, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, причем указанные цепи содержат набор из последовательности варибельной области тяжелой цепи и последовательности варибельной области легкой цепи, причем указанный набор выбран из группы, состоящей из:

i. SEQ ID NO: 17 и 19; и

ii. SEQ ID NO: 21 и 23.

Согласно настоящему изобретению также предложены антитела и их связывающие фрагменты, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, причем указанные цепи содержат набор из последовательности варибельной области тяжелой цепи, представленной в SEQ

ID NO: 28, и последовательности вариабельной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 26.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации антитело представляет собой выделенное моноклональное антитело.

5 В соответствии с конкретными вариантами реализации МАТ представляет собой химерное МАТ.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации МАТ или химерное МАТ содержит константную область, выбранную из группы, состоящей из: IgG1 мыши, IgG2a мыши, IgG2b мыши, IgG3 мыши, IgG1 человека, IgG2 человека, IgG3 человека и IgG4 человека. Каждый возможный вариант представляет собой отдельный вариант реализации настоящего изобретения.

В соответствии с другими вариантами реализации химерное МАТ содержит константную область человеческого происхождения.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации константные области человека химерного МАТ выбраны из группы, состоящей из: IgG1 человека, IgG2 человека, IgG3 человека и IgG4 человека.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации константная область человека химерного МАТ представляет собой IgG1 человека.

В соответствии с конкретными вариантами реализации антитело представляет собой фрагмент антитела. В соответствии с конкретным вариантом реализации фрагмент антитела выбран из группы, состоящей из: Fab, Fab', F(ab)₂, Fd, Fd', Fv, dAb, выделенного участка CDR, одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), одноцепочечного антитела (scab), «диател» и «линейных антител». Каждый возможный вариант представляет собой отдельный вариант реализации настоящего изобретения.

25 Согласно настоящему изобретению также предложены гуманизированные антитела, содержащие набор из шести CDR любого из МАТ, описанных в настоящей заявке.

Согласно некоторым вариантам реализации гуманизированное антитело или фрагмент антитела содержит набор из шести CDR, причем: CDR1 тяжелой цепи представляет собой GYX₁FX₂SY (SEQ ID NO: 1), где X₁ обозначает N, D, A, Q, S или T; и X₂ представляет собой T или A, или SYWIN (SEQ ID NO: 7); CDR2 тяжелой цепи представляет собой YPGSYIP (SEQ ID NO: 2); CDR3 тяжелой цепи представляет собой GYFDV (SEQ ID NO: 3); CDR1 легкой цепи представляет собой KSSQSLLXSGNQKNYLA (SEQ ID NO: 4), где X представляет собой N или S; CDR2 легкой цепи представляет собой GASTRES (SEQ ID NO: 5); и CDR3 легкой цепи представляет собой QNDHSYPYT (SEQ ID NO: 6).

В соответствии с некоторыми вариантами реализации гуманизированное антитело содержит CDR1 тяжелой цепи, имеющий GYTFTSY (SEQ ID NO: 13).

В соответствии с конкретными вариантами реализации гуманизированное антитело содержит CDR1 легкой цепи, имеющий KSSQSLSSGNQKNYLA (SEQ ID NO: 15).

5 В соответствии с определенными вариантами реализации гуманизированное антитело или фрагмент антитела содержит набор из шести CDR, причем: CDR1 тяжелой цепи представляет собой GYTFTSY (SEQ ID NO: 13); CDR2 тяжелой цепи представляет собой YPGSYIP (SEQ ID NO: 2); CDR3 тяжелой цепи представляет собой GYFDV (SEQ ID NO: 3); CDR1 легкой цепи представляет собой KSSQSLSSGNQKNYLA (SEQ ID NO: 15); CDR2 легкой цепи представляет собой GASTRES (SEQ ID NO: 5); и CDR3 легкой цепи представляет собой QNDHSYPYT (SEQ ID NO: 6).

В соответствии с некоторыми вариантами реализации гуманизированное антитело содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 и SEQ ID NO: 39, или ее аналога или производного, имеющего по меньшей мере 90% идентичности последовательности с указанной последовательностью вариабельной области тяжелой цепи. Каждый возможный вариант представляет собой отдельный вариант реализации настоящего изобретения.

20 В соответствии с некоторыми вариантами реализации гуманизированное антитело содержит последовательность вариабельной области легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 42, или ее аналога или производного, имеющего по меньшей мере 90% идентичности последовательности с указанной последовательностью вариабельной области тяжелой цепи. Каждый возможный вариант представляет собой отдельный вариант реализации настоящего изобретения.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации гуманизированное антитело содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38 и SEQ ID NO: 39, и последовательность вариабельной области легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 42, или их аналога или производного, имеющего по меньшей мере 95% идентичности последовательности с указанными последовательностями вариабельной области.

35 В соответствии с некоторыми вариантами реализации гуманизированное антитело

содержит тяжелую цепь и легкую цепь, причем указанные цепи содержат набор из последовательности переменных области тяжелой цепи и последовательности переменных области легкой цепи, при этом указанный набор выбран из группы, состоящей из:

- 5 i. SEQ ID NO: 39 и 40 (обозначено как антитело H11K1);
 ii. SEQ ID NO: 39 и 41 (обозначено как антитело H11K2); и
 iii. SEQ ID NO: 39 и 42 (обозначено как антитело H11K3).

В соответствии с некоторыми вариантами реализации предложен конъюгат, содержащий антитело или его фрагмент, описанный в настоящей заявке.

10 Конъюгат в соответствии с некоторыми вариантами реализации настоящего изобретения содержит антитело или его фрагмент, определенный выше, присоединенный непосредственно или через спейсер или линкер к фрагменту, включая, но не ограничиваясь перечисленными, радиоактивный фрагмент, метку и цитотоксический фрагмент.

15 Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложены полинуклеотидные последовательности, кодирующие антитела, обладающие высокой аффинностью и специфичностью в отношении CD112R человека, а также векторы и клетки-хозяева, несущие эти полинуклеотидные последовательности.

20 В соответствии с некоторыми вариантами реализации предложены полинуклеотидные последовательности, кодирующие аминокислотные последовательности переменных области тяжелой цепи и переменных области легкой цепи, описанных выше.

25 В соответствии с некоторыми вариантами реализации полинуклеотидная последовательность кодирует антитело или фрагмент антитела, и содержит последовательность, представленную в последовательности, выбранной из группы, состоящей из: (i) SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 18; (ii) SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 22; и (iii) SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 25, или их аналога или производного, имеющего по меньшей мере 90% идентичности последовательности с указанными последовательностями переменных области. Каждый возможный вариант представляет собой отдельный вариант реализации настоящего изобретения.

35 В соответствии с некоторыми другими вариантами реализации полинуклеотидная последовательность в соответствии с настоящим изобретением кодирует антитело или фрагмент антитела или цепь, содержащую набор из шести CDR, причем: CDR1 тяжелой цепи представляет собой GYX₁FX₂SY (SEQ ID NO: 1), где X₁ обозначает N, D, A, Q, S или T; и X₂ представляет собой T или A, или SYWIN (SEQ ID NO: 7); CDR2 тяжелой цепи

представляет собой YPGSYIP (SEQ ID NO: 2); CDR3 тяжелой цепи представляет собой GYFDV (SEQ ID NO: 3); CDR1 легкой цепи представляет собой KSSQSLLXSGNQKNYLA (SEQ ID NO: 4), где X обозначает N или S; CDR2 легкой цепи представляет собой GASTRES (SEQ ID NO: 5); и CDR3 легкой цепи представляет собой QNDHSYPYT (SEQ ID NO: 6).

В соответствии с некоторыми другими вариантами реализации полинуклеотидная последовательность в соответствии с настоящим изобретением кодирует антитело или фрагмент антитела, содержащий набор из шести CDR, причем: последовательность CDR1 тяжелой цепи содержит последовательность GYTFTSY (SEQ ID NO: 13), CDR2 тяжелой цепи содержит последовательность YPGSYIP (SEQ ID NO: 2), CDR3 тяжелой цепи содержит последовательность GYFDV (SEQ ID NO: 3), CDR1 легкой цепи, содержит последовательность KSSQSLLSSGNQKNYLA (SEQ ID NO: 15), CDR2 легкой цепи содержит последовательность GASTRES (SEQ ID NO: 5), и CDR3 легкой цепи, содержит последовательность QNDHSYPYT (SEQ ID NO: 6).

В соответствии с некоторыми вариантами реализации полинуклеотидные последовательности, определенные выше, кодируют молекулу, выбранную из группы, состоящей из: антитела, фрагмента антитела, содержащего по меньшей мере антигенсвязывающую часть, цепи антитела и конъюгата антитела, содержащего указанное антитело или фрагмент антитела. Каждый возможный вариант представляет собой отдельный вариант реализации настоящего изобретения.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации полинуклеотидная последовательность кодирует переменную область тяжелой цепи моноклонального антитела, и содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, или ее вариант, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации полинуклеотидная последовательность кодирует переменную область тяжелой цепи моноклонального антитела, и содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, или ее вариант, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации полинуклеотидная последовательность кодирует переменную область тяжелой цепи моноклонального антитела, и содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24, или ее вариант, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации полинуклеотидная последовательность кодирует переменную область легкой цепи моноклонального антитела, и содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18, или ее

вариант, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации полинуклеотидная последовательность кодирует переменную область легкой цепи моноклонального антитела, и содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22, или ее вариант, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации полинуклеотидная последовательность кодирует переменную область легкой цепи моноклонального антитела, и содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25, или ее вариант, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации настоящего изобретения предложен полипептид, содержащий по меньшей мере одну последовательность, кодируемую по меньшей мере одной полинуклеотидной последовательностью, раскрытой выше.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения предложена конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере одну цепь антитела или ее фрагмент, как описано в настоящей заявке. В соответствии с некоторыми вариантами реализации конструкция нуклеиновой кислоты представляет собой плазмиду.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации плазида содержит по меньшей мере одну полинуклеотидную последовательность, представленную в последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 25. Каждый возможный вариант представляет собой отдельный вариант реализации настоящего изобретения.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложена клетка, способная продуцировать антитело или фрагмент антитела, содержащий определенные последовательности CDR и/или определенные переменные области тяжелой и легкой цепей, описанные в настоящей заявке.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации предложена клетка или популяция клеток, содержащая по меньшей мере одну полинуклеотидную последовательность, раскрытую выше.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации клетка, продуцирующая моноклональное антитело, представляет собой клетку гибридомы.

Согласно настоящему изобретению предложена, в соответствии с другим аспектом, фармацевтическая композиция, содержащая в качестве активного ингредиента по меньшей мере одно антитело, фрагмент антитела или его конъюгаты, как описано в

настоящей заявке, и необязательно по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, разбавитель, соль или носитель.

Согласно некоторым вариантам реализации фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере одно антитело, содержащее набор из шести CDR, причем: CDR1 тяжелой цепи представляет собой GYX_1FX_2SY (SEQ ID NO: 1), где X_1 обозначает N, D, A, Q, S или T; и X_2 представляет собой T или A, или SYWIN (SEQ ID NO: 7); CDR2 тяжелой цепи представляет собой YPGSYIP (SEQ ID NO: 2); CDR3 тяжелой цепи представляет собой GYFDV (SEQ ID NO: 3); CDR1 легкой цепи представляет собой KSSQSLLXSGNQKNYLA (SEQ ID NO: 4), где X обозначает N или S; CDR2 легкой цепи представляет собой GASTRES (SEQ ID NO: 5); и CDR3 легкой цепи представляет собой QNDHSYPYT (SEQ ID NO: 6).

В соответствии с некоторыми вариантами реализации фармацевтическая композиция содержит антитело или его фрагмент, содержащий последовательность CDR1 тяжелой цепи GYX_1FX_2SY (SEQ ID NO: 1), где X_2 представляет собой T. В соответствии с некоторыми вариантами реализации фармацевтическая композиция содержит антитело или его фрагмент, содержащий последовательность CDR1 тяжелой цепи GYTFTSY (SEQ ID NO: 13). В соответствии с другими вариантами реализации фармацевтическая композиция содержит антитело или его фрагмент, содержащий последовательность CDR1 тяжелой цепи GYNFASY (SEQ ID NO: 14). В соответствии с определенными вариантами реализации фармацевтическая композиция содержит антитело или его фрагмент, содержащий последовательность CDR1 тяжелой цепи SYWIN (SEQ ID NO: 7).

В соответствии с некоторыми вариантами реализации фармацевтическая композиция содержит антитело или его фрагмент, содержащий последовательность CDR1 легкой цепи KSSQSLLSSGNQKNYLA (SEQ ID NO: 15).

В соответствии с некоторыми вариантами реализации фармацевтическая композиция содержит антитело или фрагмент антитела, содержащий набор из шести CDR, причем: последовательность CDR1 тяжелой цепи содержит последовательность GYTFTSY (SEQ ID NO: 13), CDR2 тяжелой цепи содержит последовательность YPGSYIP (SEQ ID NO: 2), CDR3 тяжелой цепи содержит последовательность GYFDV (SEQ ID NO: 3), CDR1 легкой цепи содержит последовательность KSSQSLLSSGNQKNYLA (SEQ ID NO: 15), CDR2 легкой цепи содержит последовательность GASTRES (SEQ ID NO: 5), и CDR3 легкой цепи содержит последовательность QNDHSYPYT (SEQ ID NO: 6).

В соответствии с некоторыми вариантами реализации фармацевтическая композиция содержит антитело или его фрагмент, содержащий тяжелую цепь, представленную в SEQ ID NO: 39.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации фармацевтическая композиция содержит антитело или его фрагмент, содержащий переменную область легкой цепи, имеющую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 42. Каждый возможный вариант представляет собой отдельный вариант реализации настоящего изобретения.

В соответствии с конкретным вариантом реализации фармацевтическая композиция содержит антитело или его фрагмент, содержащий переменную область тяжелой цепи, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 39, и переменную область легкой цепи, имеющую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 42.

Также предложены молекулы одноцепочечного переменного фрагмента (scFv) антител согласно настоящему изобретению. Молекулы scFv содержат антигенсвязывающий сайт антитела, экспрессируемый в виде одной полипептидной цепи. В соответствии с некоторыми вариантами реализации настоящего изобретения предложены молекулы scFv, содержащие переменные области тяжелой цепи и легкой цепи антител к CD112R. В соответствии с определенными вариантами реализации scFv содержит шарнирную область между двумя переменными областями. В соответствии с конкретными вариантами реализации scFv содержит тяжелые и легкие цепи гуманизированных антител, описанных в настоящей заявке.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации scFv содержит сайт связывания CD112R, содержащий шесть последовательностей CDR, выбранных из группы, состоящей из:

i. трех определяющих комплементарность участков (CDR) переменной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 28, и трех CDR переменной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 26, или их аналога или производного, имеющего по меньшей мере 90% идентичности последовательности с указанной последовательностью антитела или фрагмента; и

ii. трех CDR переменной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 17, и трех CDR переменной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 19, или их аналога или производного, имеющего по меньшей мере 90% идентичности последовательности с указанной последовательностью антитела или фрагмента.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации scFv содержит сайт связывания CD112R, содержащий набор из шести CDR, причем: CDR1 тяжелой цепи представляет собой GYX₁FX₂SY (SEQ ID NO: 1), где X₁ обозначает N, D, A, Q, S или T; и

X₂ представляет собой T или A, или SYWIN (SEQ ID NO: 7); CDR2 тяжелой цепи представляет собой YPGSYIP (SEQ ID NO: 2); CDR3 тяжелой цепи представляет собой GYFDV (SEQ ID NO: 3); CDR1 легкой цепи представляет собой KSSQSLXSGNQKNYLA (SEQ ID NO: 4), где X обозначает N или S; CDR2 легкой цепи представляет собой GASTRES (SEQ ID NO: 5); и CDR3 легкой цепи представляет собой QNDHSYPYT (SEQ ID NO: 6).

В соответствии с некоторыми вариантами реализации scFv содержит последовательность CDR1 тяжелой цепи GYX₁FX₂SY (SEQ ID NO: 1), где X₂ представляет собой T. В соответствии с некоторыми вариантами реализации scFv содержит последовательность CDR1 тяжелой цепи GYTFTSY (SEQ ID NO: 13). В соответствии с другими вариантами реализации scFv содержит последовательность CDR1 тяжелой цепи GYNFASY (SEQ ID NO: 14). В соответствии с определенными вариантами реализации scFv содержит последовательность CDR1 тяжелой цепи SYWIN (SEQ ID NO: 7).

В соответствии с некоторыми вариантами реализации scFv содержит последовательность CDR1 легкой цепи KSSQSLSSGNQKNYLA (SEQ ID NO: 15).

В соответствии с некоторыми вариантами реализации scFv содержит набор из шести CDR, причем: последовательность CDR1 тяжелой цепи содержит последовательность GYTFTSY (SEQ ID NO: 13), CDR2 тяжелой цепи содержит последовательность YPGSYIP (SEQ ID NO: 2), CDR3 тяжелой цепи содержит последовательность GYFDV (SEQ ID NO: 3), CDR1 легкой цепи содержит последовательность KSSQSLSSGNQKNYLA (SEQ ID NO: 15), CDR2 легкой цепи содержит последовательность GASTRES (SEQ ID NO: 5), и CDR3 легкой цепи содержит последовательность QNDHSYPYT (SEQ ID NO: 6).

В соответствии с некоторыми вариантами реализации scFv содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29-39.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации scFv содержит последовательность вариабельной области легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 40-42.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации scFv содержит линкер, соединяющий вариабельные области тяжелой цепи и легкой цепи. В соответствии с некоторыми вариантами реализации линкер представляет собой глицин-сериновый (GlySer) линкер. В соответствии с некоторыми вариантами реализации линкер содержит (GS)_n, (GSGGS)_n, (GGGS)_n или (GGGGS)_n, где n представляет собой целое число, выбранное из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В соответствии с некоторыми вариантами

реализации линкер содержит 2-6 повторов последовательности GGGS. В соответствии с определенными примерными вариантами реализации линкер, содержащий три или четыре повтора последовательности GGGS, соединяет две переменные области в пределах scFv. В соответствии с некоторыми вариантами реализации переменная область тяжелой цепи находится на N-концевой стороне scFv и соединена линкером (GGGS)₃ с переменной областью легкой цепи. В соответствии с некоторыми вариантами реализации переменная область легкой цепи находится на N-концевой стороне scFv и соединена линкером (GGGS)₄ с переменной областью тяжелой цепи.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации scFv содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 43-54, или их аналог или производное, имеющее по меньшей мере 90% идентичности последовательности с указанным антигеном. Каждый возможный вариант представляет собой отдельный вариант реализации настоящего изобретения.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации scFv содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 43-54. В соответствии с определенными вариантами реализации scFv состоит из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 43-54.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации scFv соединен с областью Fc человека с образованием scFv-Fc. В соответствии с некоторыми вариантами реализации Fc представляет собой IgG1 человека.

Также предложены фармацевтические композиции, содержащие по меньшей мере одно антигено, фрагмент антигена или конъюгат антигена в соответствии с настоящим изобретением, для применения в восстановлении цитотоксичности NK путем ингибирования связывания CD112R, экспрессируемого на NK-клетках, с нектином-2 (CD112).

В соответствии с другими вариантами реализации антигено или фрагмент антигена способен ингибировать связывание CD112R человека, экспрессируемого на Т-клетках, с нектином-2.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере одно антигено, фрагмент антигена или конъюгат антигена в соответствии с настоящим изобретением и антигено к PD-1. В соответствии с некоторыми вариантами реализации фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере одно антигено, фрагмент антигена или конъюгат антигена в соответствии с настоящим изобретением и антигено к TIGIT. В соответствии с некоторыми вариантами реализации фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере одно антигено, фрагмент

антитела или конъюгат антитела в соответствии с настоящим изобретением и антитело к PVR. В соответствии с некоторыми вариантами реализации фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере одно антитело, фрагмент антитела или конъюгат антитела в соответствии с настоящим изобретением и антитело к CTLA-4.

5 В соответствии с некоторыми вариантами реализации фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим изобретением предназначена для применения в иммунотерапии рака или усилении иммунных ответов.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации настоящего изобретения рак
10 выбран из группы, состоящей из рака легкого, рака молочной железы, колоректального рака, меланомы, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака толстой кишки, рака шейки матки, рака почки, рака щитовидной железы, рака предстательной железы, рака головного мозга, почечного рака, рака горла, карциномы гортани, рака мочевого пузыря, рака печени, фибросаркомы, рака из клеток эндометрия, глиобластомы, саркомы, миелоидного рака, лейкоза и лимфомы. Каждый возможный вариант представляет собой
15 отдельный вариант реализации настоящего изобретения.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации рак представляет собой солидный рак. В соответствии с некоторыми конкретными вариантами реализации солидный рак выбран из группы, состоящей из рака молочной железы, рака легкого, рака мочевого пузыря, рака поджелудочной железы и рака яичника.

20 В соответствии с некоторыми вариантами реализации рак представляет собой аденокарциному легкого. В соответствии с некоторыми вариантами реализации рак представляет собой аденокарциному молочной железы. В соответствии с некоторыми вариантами реализации рак представляет собой колоректальный рак.

В соответствии с определенными вариантами реализации рак выбран из группы,
25 состоящей из: рака молочной железы, колоректального рака, рака легкого, рака почек, меланомы, рака предстательной железы и рака головного мозга. Каждый возможный вариант представляет собой отдельный вариант реализации настоящего изобретения.

В соответствии с другими вариантами реализации рак представляет собой гемобластоз. В соответствии с некоторыми вариантами реализации гемобластоз выбран из
30 лейкоза, лимфомы и множественной миеломы. Каждый возможный вариант представляет собой отдельный вариант реализации настоящего изобретения.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации фармацевтическая композиция предназначена для совместного применения с лимфоцитами человека в лечении рака.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации лимфоциты человека
35 представляют собой клетки-киллеры, выбранные из группы, состоящей из: Т-клеток, NK-

клеток и NKT-клеток. Каждый возможный вариант представляет собой отдельный вариант реализации настоящего изобретения.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации клетки-киллеры являются аутологичными или аллогенными.

5 В соответствии с некоторыми вариантами реализации фармацевтическая композиция предназначена для применения в лечении вирусной инфекции.

В соответствии с определенными вариантами реализации фармацевтическая композиция предназначена для применения в лечении хронических инфекций. В соответствии с примерными вариантами реализации фармацевтическая композиция
10 предназначена для применения в лечении вирусной инфекции, выбранной из группы, состоящей из инфекции вируса гепатита С (HCV), инфекции полиомавируса (JCV) и инфекции вируса ВК (BKV).

В соответствии с еще одним аспектом настоящего изобретения предложен способ ингибирования связывания CD112R человека с нектином-2 с помощью моноклонального
15 антитела или фрагмента антитела, определенного в настоящей заявке.

В соответствии с дополнительным аспектом настоящего изобретения предложен способ усиления иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества антитела или
фрагмента антитела, описанного в настоящей заявке.

20 В соответствии с еще одним аспектом настоящего изобретения предложен способ лечения рака, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество антитела или фрагмента антитела, описанного в настоящей заявке.

В соответствии с еще одним аспектом настоящего изобретения предложен способ
25 лечения рака, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества антитела или фрагмента антитела к CD112R, описанного в настоящей заявке; и терапевтически эффективного количества антитела к PD-1, TIGIT или PVR. Каждый возможный вариант представляет собой отдельный вариант реализации настоящего изобретения. Введение антитела к CD112R и антитела к PD-1, TIGIT или PVR
30 может представлять собой комбинированное введение или последовательное введение в любом порядке введения.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации настоящего изобретения терапевтически эффективное количество приводит к уменьшению размера опухоли или
числа метастазов у субъекта.

35 В соответствии с некоторыми вариантами реализации способ лечения рака включает

введение или выполнение по меньшей мере одной дополнительной противораковой терапии. В соответствии с определенными вариантами реализации дополнительная противораковая терапия представляет собой хирургическое вмешательство, химиотерапию, лучевую терапию или иммунотерапию.

5 В соответствии с некоторыми вариантами реализации способ лечения рака включает введение антитела и дополнительного противоракового агента. В соответствии с некоторыми вариантами реализации дополнительный противораковый агент выбран из группы, состоящей из: иммуномодулятора, агента, ингибирующего иммунный коингибирующий рецептор, активированных лимфоцитарных клеток, ингибитора киназы
10 и химиотерапевтического агента.

В соответствии с другими вариантами реализации дополнительный иммуномодулятор представляет собой антитело, фрагмент антитела или конъюгат антитела, который связывается с нектином-2 человека.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации дополнительный
15 иммуномодулятор представляет собой антитело к молекуле иммунной контрольной точки. В соответствии с некоторыми вариантами реализации дополнительный иммуномодулятор представляет собой антитело к молекуле иммунной контрольной точки, выбранной из группы, состоящей из человеческого белка запрограммированной клеточной смерти 1 (PD-1), PD-L1 и PD-L2, молекулы адгезии клеток, связанной с карциноэмбриональным
20 антигеном 1 (CEACAM1), гена активации лимфоцитов 3 (LAG3), CD137, OX40 (также называемого CD134), иммуноглобулиноподобных рецепторов клеток-киллеров (KIR), TIGIT, PVR, CTLA-4, NKG2A, GITR и любой другой молекулы контрольных точек или их комбинации. Каждый возможный вариант представляет собой отдельный вариант реализации настоящего изобретения.

25 В соответствии с определенными вариантами реализации дополнительный иммуномодулятор представляет собой антитело к PD-1. В соответствии с определенными вариантами реализации дополнительный иммуномодулятор представляет собой антитело к TIGIT. В соответствии с определенными вариантами реализации дополнительный иммуномодулятор представляет собой антитело к PVR. В соответствии с некоторыми
30 вариантами реализации дополнительный иммуномодулятор представляет собой антитело к CTLA-4.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации настоящего изобретения иммунный коингибирующий рецептор выбран из группы, состоящей из PD-1, TIGIT, PVR, CTLA-4, LAG3, TIM3, BTLA, VISTA, B7H4, CD96, BY55 (CD 160), LAIR1, SIGLEC10 и
35 2B4. Каждый возможный вариант представляет собой отдельный вариант реализации

настоящего изобретения.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации противораковый агент выбран из группы, состоящей из: эрбитукса, цитарабина, флударабина, фторурацила, меркаптопурина, метотрексата, тиогуанина, гемцитабина, винкристина, винбластина, винорелбина, кармустина, ломустатина, хлорамбуцила, циклофосфамида, цисплатина, карбоплатина, ифосфамида, мехлорэтамину, мелфалана, тиотепы, дакарбазина, блеомицина, дактиномицина, даунорубицина, доксорубицина, идарубицина, митомицина, митоксантрона, пликамицина, этопозиды, тенипозиды и любой их комбинации. Каждый возможный вариант представляет собой отдельный вариант реализации настоящего изобретения.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации противораковый агент представляет собой ингибитор рецептора эпидермального фактора роста (EGFR). В соответствии с некоторыми вариантами реализации ингибитор EGFR выбран из группы, состоящей из: цетуксимаба (эрбитукс®), панитумумаба (вектибикс®) и нецитумумаба (портразза®). Каждый возможный вариант представляет собой отдельный вариант реализации настоящего изобретения.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации настоящего изобретения субъект представляет собой субъекта-человека.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации настоящего изобретения иммунная клетка представляет собой Т-клетку.

Согласно аспекту настоящего изобретения предложен способ модуляции функции и/или активности иммунной системы, включающий модуляцию связывания CD112R с нектином-2 с помощью антитела в соответствии с настоящим изобретением.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации способ лечения рака включает предотвращение или уменьшение образования, роста или распространения метастазов у субъекта.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации способ лечения рака включает введение нуждающемуся в этом субъекту фармацевтической композиции, содержащей антитело или фрагмент указанного антитела, способный ингибировать связывание CD112R человека с нектином-2 человека, и дополнительно введение указанному субъекту лимфоцитов человека.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации лимфоциты человека представляют собой клетки-киллеры, выбранные из группы, состоящей из: Т-клеток, НК-клеток и NKT-клеток.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации клетки-киллеры являются

аутологичными или аллогенными.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ предотвращения или лечения вирусной инфекции, включающий введение субъекту антитела или его фрагмента, содержащего по меньшей мере антигенсвязывающий домен, описанного в настоящей заявке, причем указанное MAT или его фрагмент способен ингибировать связывание CD112R с нектином-2.

Настоящее изобретение дополнительно включает, в соответствии с другим аспектом, способ определения или количественной оценки CD112R в образце, причем указанный способ включает приведение биологического образца в контакт с антителом или фрагментом антитела и измерение уровня образования комплекса, при этом указанное антитело или фрагмент антитела содержит:

i. набор из шести CDR, причем: CDR1 тяжелой цепи представляет собой GYX₁FX₂SY (SEQ ID NO: 1), где X₁ обозначает N, D, A, Q, S или T; и X₂ обозначает T или A, или SYWIN (SEQ ID NO: 7); CDR2 тяжелой цепи представляет собой YPGSYIP (SEQ ID NO: 2); CDR3 тяжелой цепи представляет собой GYFDV (SEQ ID NO: 3); CDR1 легкой цепи представляет собой KSSQSLLXSGNQKNYLA (SEQ ID NO: 4), где X обозначает N или S; CDR2 легкой цепи представляет собой GASTRES (SEQ ID NO: 5); и CDR3 легкой цепи представляет собой QNDHSYPYT (SEQ ID NO: 6); или

ii. набор из шести CDR, причем: последовательность CDR1 тяжелой цепи представляет собой GYNFTSY (SEQ ID NO: 9) или SYWIN (SEQ ID NO: 7); CDR2 тяжелой цепи представляет собой FPGSYS (SEQ ID NO: 10); CDR3 тяжелой цепи представляет собой GYFDV (SEQ ID NO: 3); CDR1 легкой цепи представляет собой KSSQSLLNSGSQKNYLA (SEQ ID NO: 11); CDR2 легкой цепи представляет собой GASTRES (SEQ ID NO: 5); и CDR3 легкой цепи представляет собой QNDHSYPYT (SEQ ID NO: 6).

В соответствии с некоторыми вариантами реализации способ включает приведение биологического образца в контакт с антителом или фрагментом антитела, содержащим набор из шести CDR, причем: последовательность CDR1 тяжелой цепи содержит последовательность GYTFTSY (SEQ ID NO: 13), CDR2 тяжелой цепи содержит последовательность YPGSYIP (SEQ ID NO: 2), CDR3 тяжелой цепи содержит последовательность GYFDV (SEQ ID NO: 3), CDR1 легкой цепи содержит последовательность KSSQSLLSSGNQKNYLA (SEQ ID NO: 15), CDR2 легкой цепи содержит последовательность GASTRES (SEQ ID NO: 5), и CDR3 легкой цепи содержит

последовательность QNDHSPYPT (SEQ ID NO: 6).

В соответствии с некоторыми вариантами реализации способ детектирования или количественной оценки экспрессии CD112R включает следующие этапы:

- 5 i. инкубацию образца с антителом, специфичным в отношении CD112R, или фрагментом указанного антитела, содержащим по меньшей мере антигенсвязывающую часть; и
- ii. детектирование связанного CD112R с помощью детектируемого зонда.

10 В соответствии с некоторыми вариантами реализации способ дополнительно включает этапы:

- iii. сравнения количества (ii) со стандартной кривой, полученной для референсного образца, содержащего известное количество CD112R; и
- iv. вычисления количества CD112R в образце на основании стандартной кривой.

15 Антитела в соответствии с настоящим изобретением также могут применяться для создания методов скрининга. Например, иммуноферментный анализ (ИФА) или радиоиммуноанализ (RIA), а также такие методы как иммуногистохимия (ИГХ) или флуоресцентно-активированная сортировка клеток (FACS), могут быть разработаны для измерения уровней секретируемого или ассоциированного с клеткой CD112R в
20 биологическом образце с помощью антител и методов, известных в данной области техники.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации биологический образец представляет собой жидкость или ткань организма. В соответствии с дополнительным вариантом реализации образец представляет собой образец ткани организма.

25 В соответствии с некоторыми вариантами реализации способ выполняют *in vitro* или *ex vivo*.

В соответствии с аспектом настоящего изобретения предложен способ диагностики или прогнозирования рака у субъекта, причем указанный способ включает определение уровня экспрессии CD112R в биологическом образце от указанного субъекта с помощью
30 по меньшей мере одного антитела, описанного в настоящей заявке.

Также предложен набор для измерения экспрессии или наличия CD112R в биологическом образце, содержащий по меньшей мере одно антитело или фрагмент антитела в соответствии с настоящим изобретением. В соответствии с некоторыми вариантами реализации набор содержит антитело или фрагмент антитела, содержащий:

- 35 i. набор из шести CDR, причем: CDR1 тяжелой цепи представляет

собой GYX₁FX₂SY (SEQ ID NO: 1), где X₁ обозначает N, D, A, Q, S или T; и X₂ обозначает T или A, или SYWIN (SEQ ID NO: 7); CDR2 тяжелой цепи представляет собой YPGSYIP (SEQ ID NO: 2); CDR3 тяжелой цепи представляет собой GYFDV (SEQ ID NO: 3); CDR1 легкой цепи представляет собой KSSQSLXSGNQKNYLA (SEQ ID NO: 4), где X обозначает N или S; CDR2 легкой цепи представляет собой GASTRES (SEQ ID NO: 5); и CDR3 легкой цепи представляет собой QNDHSYPYT (SEQ ID NO: 6); или

ii. набор из шести CDR, причем: последовательность CDR1 тяжелой цепи представляет собой GYNFTSY (SEQ ID NO: 9) или SYWIN (SEQ ID NO: 7); CDR2 тяжелой цепи представляет собой FPGSYS (SEQ ID NO: 10); CDR3 тяжелой цепи представляет собой GYFDV (SEQ ID NO: 3); CDR1 легкой цепи представляет собой KSSQSLNLSGSQKNYLA (SEQ ID NO: 11); CDR2 легкой цепи представляет собой GASTRES (SEQ ID NO: 5); и CDR3 легкой цепи представляет собой QNDHSYPYT (SEQ ID NO: 6).

В соответствии с некоторыми вариантами реализации набор содержит антитело или фрагмент антитела, содержащий набор из шести CDR, причем: последовательность CDR1 тяжелой цепи содержит последовательность GYTFTSY (SEQ ID NO: 13), CDR2 тяжелой цепи содержит последовательность YPGSYIP (SEQ ID NO: 2), CDR3 тяжелой цепи содержит последовательность GYFDV (SEQ ID NO: 3), CDR1 легкой цепи содержит последовательность KSSQSLSSGNQKNYLA (SEQ ID NO: 15), CDR2 легкой цепи содержит последовательность GASTRES (SEQ ID NO: 5), и CDR3 легкой цепи содержит последовательность QNDHSYPYT (SEQ ID NO: 6).

Любой вариант реализации, раскрытый в настоящей заявке выше, может быть необязательно объединен с объектом изобретения одного или любой комбинации другого варианта реализации, раскрытого в настоящей заявке. Дополнительные варианты реализации и полный объем области применения настоящего изобретения станут понятны из подробного описания изобретения, приведенного далее в настоящей заявке. Тем не менее, следует понимать, что подробное описание изобретения и конкретные примеры, хотя в них и описаны предпочтительные варианты реализации настоящего изобретения, приведены исключительно в целях иллюстрации, так как разные изменения и модификации, не выходящие за рамки сущности и объема изобретения, будут понятны специалистам в данной области техники после изучения этого подробного описания изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигуры 1A-1D отображают уровни экспрессии CD112R на различных иммунных клетках. **Фиг. 1A** - уровни транскрипта PVRIG из базы данных экспрессии генов для иммунных клеток (DICE). **Фигуры 1B-1D** показывают анализ FACS окрашивания различных иммунных клеток с помощью МАТ к CD112R согласно настоящему изобретению (супернатанты гибридом). **Фиг. 1B** - покоящиеся МКПК не имели детектируемых уровней CD112R; **Фиг. 1C** - устойчивая экспрессия CD112R наблюдалась на Т-клетках после 96-часовой активации МКПК; **Фиг. 1D** - устойчивая экспрессия CD112R активированными НК-клетками. Заполненные гистограммы отображают фоновое окрашивание. Две пустые гистограммы на каждом графике представляют собой окрашивание двумя клонами МАТ к CD112R (№13 и №15). Показаны результаты, полученные для двух независимых здоровых доноров.

Фигура 2 представляет собой схематическую иллюстрацию рецепторов, экспрессируемых на NK/CD8 Т-клетках (TIGIT, DNAM-1, CD112R), и их соответствующие величины аффинности в отношении нектин-2, экспрессируемого опухолями или антигенпрезентирующими клетками (АПК).

Фигуры 3A-3C представляют анализ связывания и блокирования некоторых из МАТ к CD112R согласно настоящему изобретению. **Фиг. 3A** иллюстрирует специфичное связывание, определенное с помощью анализа FACS, клонов МАТ к CD112R с клетками 293Т, которые сверхэкспрессируют CD112R, но не с исходными клетками. **Фиг. 3B** - Рассчитанные значения ЭК₅₀: химерные МАТ к CD112R использовали в концентрации от 99 до 0,4 нМ в ряде трехкратных разведений и инкубировали с клетками НЕК 293Т (клетки человеческой эмбриональной почки 293), которые сверхэкспрессируют CD112R. Для детектирования использовали АРС-антитело к белку человека (Ab) в разведении 1:200 и анализировали связывание клеток с помощью FACS. **Фиг. 3C** - Клетки 8866 (клетки хронического миелолейкоза), сверхэкспрессирующие нектин-2 человека, инкубировали с 10 мкг/мл CD112R-Fc в присутствии изотипического контрольного антитела или с указанными клонами при 4 мкг/мл. Связанный CD112R-Fc детектировали с помощью Dy-647-антитела к белку мыши, разведенного в соотношении 1:250, и анализировали с помощью FACS. Блокирование связывания CD112R всеми вариантами превысило 95%.

Фигуры 4A-4C иллюстрируют блокирование CD112R с помощью МАТ к CD112R и его влияние на активацию НК-клеток. Активацию НК измеряли по индукции поверхностной экспрессии CD107a и выражали как кратность изменения по сравнению с контрольным IgG (ось Y). Результаты показаны для линий раковых клеток человека A549 (аденокарцинома легкого; **Фиг. 4A и 4B**) и MDA-MB-231 (аденокарцинома молочной

железы; **Фиг. 4С**). **Фиг. 4А** - Активность антитела к CD112R с мышиной Fc IgG1 (mIgG1, инертная Fc без детектируемого связывания с CD16 человека) сравнивали с химерным клоном с теми же Fab и с химерным клоном VH0K0, содержащим N31S (также обозначен в настоящей заявке N27dS в соответствии с нумерацией по Kabat), оба из которых имеют Fc IgG1 человека (hIgG1, эффекторная Fc, способная активировать CD16 человека). **Фиг. 4В-4С** - Активность МАТ к CD112R сравнивали с активностью комбинации указанного антитела с антителами против ингибитора иммунной контрольной точки (ICI), а именно с МАТ к TIGIT (VSIG#9, описано в WO2017037707) и МАТ к PVR (названо NTX-1088), как указано. * $p < 0,03$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ согласно двустороннему t-критерию Стьюдента. Показаны типичные данные для двух из пяти доноров.

Фигуры 5А-5В иллюстрируют влияние блокирования CD112R с помощью МАТ к CD112R (клон 13 N31S) на опосредуемое Т-клетками уничтожение клеток-мишеней. Влияние блокирования CD112R дополнительно изучали в присутствии дополнительных ICI, таких как TIGIT и PD-1. Уничтожение клеток-мишеней нормировали к уничтожению, которое наблюдалось без добавления антитела (ось Y). Результаты показаны для линий раковых клеток человека A549 (аденокарцинома легкого, **Фиг. 5А**) и RKO (колоректальный рак, **Фиг. 5В**). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0005$ согласно двустороннему t-критерию Стьюдента.

Фигура 6 показывает влияние гуманизированных антител к CD112R на активацию НК-клеток. Активацию НК-клеток оценивали по индукции поверхностной экспрессии CD107a, измеренной с помощью анализа FACS, и выражали как кратность изменения по сравнению с контрольным IgG (ось Y). Результаты показаны для НК-клеток, выделенных у здорового добровольца-человека, которые были совместно инкубированы с линией раковых клеток человека A549 (аденокарцинома легкого). Инкубацию проводили в присутствии различных гуманизированных клонов антитела к CD112R или с изотипическим контрольным IgG, как показано на оси X, с дополнительными МАТ к TIGIT или без них. Все антитела добавляли при 3 мкг/мл.

Фигуры 7А-7В показывают влияние отобранного гуманизированного антитела к CD112R, отдельно и в комбинации с антителом к PVR, на активацию НК-клеток. Активацию НК-клеток измеряли по индукции поверхностного CD107a и выражали как кратность изменения по сравнению с отсутствием антитела (ось Y). **Фиг. 7А** – обработка НК-клеток, культивированных с клетками MDA-MB-231 (аденокарцинома молочной железы), отобранными гуманизированными антителами к CD112R. **Фиг. 7В** - сравнение обработки вышеуказанной культуры клеток различными гуманизированными МАТ к CD112R и МАТ к PVR (NTX-1088) по отдельности или в комбинации ($p < 0,03$; черные

столбики).

Фигуры 8А-8В иллюстрируют влияние отобранных гуманизированных антител к CD112R на активацию Т-клеток (секрецию IL-2). Клетки Jurkat, сверхэкспрессирующие CD112R человека, инкубировали с клетками A549 в присутствии антитела к CD3 с указанными МАТ к CD112R или без них. Через 24 часа супернатанты собирали и количественно определяли содержание IL-2 с использованием MAX™ Deluxe для ИФА IL-2 человека от Biolegend. **Фиг. 8А** - Анализ зависимости ответа от дозы всех гуманизированных вариантов и референсного антитела к CD112R (реф.) от 4 до 0,0625 мкг/мл. **Фиг. 8В** - Отобранные гуманизированные варианты тестировали в диапазоне концентраций от 26,4 до 0,1 нМ, и референсное антитело к CD112R добавляли только в самой высокой концентрации 24,6 нМ. Сравнение проводили с самой высокой концентрацией hIgG1.

Фигуры 9А-9В иллюстрируют влияние гуманизированного варианта МАТ к CD112R H11K2 (имеющего последовательность вариабельной области НС, представленную в SEQ ID NO:39, и последовательность вариабельной области LC, представленную в SEQ ID NO: 41) на активацию Т-клеток. Влияние блокады CD112R измеряли с блокированием дополнительных ICI, таких как PVR (NTX-1088) и PD-1 (китруда), как указано. Поверхностную экспрессию (MFI) CD69 (**Фиг. 9А**) или CD137 (4-1BB) (**Фиг. 9В**) нормировали к поверхностной экспрессии, наблюдаемой без добавления антитела (ось Y). Результаты показаны для линии раковых клеток человека A549 (аденокарцинома легкого). Все изменения статистически значимы ($p < 0,05$).

Фигуры 10А-10В показывают влияние блокады CD112R на активацию NK-клеток, когда клетки-мишени экспрессируют нектин-2, но не PVR, и влияние комбинирования антитела к CD112R с антителом к PVR (NTX-1088) на активацию NK, когда клетки-мишени коэкспрессируют нектин-2 и PVR. Активацию NK-клеток измеряли по поверхностной экспрессии CD137, которую выражали как кратность индукции по сравнению с отсутствием обработки антителом (без антитела, ось Y). Результаты показаны для линии раковых клеток человека JEG-3 (хориокарцинома) (**Фиг. 10А**), которая является PVR-отрицательной, и JEG-3-hPVR (**Фиг. 10В**), которые экспрессируют PVR человека. Антитело к CD112R с Fc hIgG1 сравнивали с антителом к PVR NTX-1088 или с антителом к TIGIT, тираголумабом (запись KEGG DRUG D11482). Кроме того, тестировали комбинации CD112R и двух МАТ. * $p < 0,005$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ согласно двустороннему t-критерию Стьюдента. Показаны типичные данные двух из пяти доноров NK-клеток. Tira = Тираголумаб.

ФИГУРЫ 11А-11С демонстрируют влияние комбинации CD112R и блокады

другого ICI на активацию NK-клеток, когда клетки-мишени экспрессируют как нектин-2, так и PVR. Результаты показаны для линии клеток немелкоклеточного рака легкого человека H1299 (Фиг. 11А), линии клеток аденокарциномы легкого A549 (Фиг. 11В) и для линии клеток аденокарциномы молочной железы MDA-MB-231 (Фиг. 11С).

5 Активность МАТ к CD112R оценивали по отдельности или в комбинации с другими антителами к ICI, как указано. * $p < 0,005$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ согласно двустороннему t-критерию Стьюдента. Показаны типичные данные для двух из четырех доноров NK-клеток. Tira = Тираголумаб.

ФИГУРА 12 демонстрирует влияние обработки МАТ к CD112R *in vivo* на рост опухоли в модели на мышах. Клетки A549 коимплантировали п/к со свежими МКПК человека при соотношении Э:М 1:5 мышам NSG-HLA-A2/HHD. Лечение начали на день 3 после имплантации. Мышам вводили один раз в неделю либо контрольный IgG1, либо МАТ к CD112R, либо МАТ к PD-1 (пембролизумаб), все при 10 мг/кг, в общей сложности 5 доз. $p=0,001$ согласно двухфакторному дисперсионному анализу.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Согласно настоящему изобретению предложены эффективные антитела, включая химерные и гуманизированные МАТ и их фрагменты, специфичные в отношении белка CD112R человека. Согласно настоящему изобретению также предложено получение и применение указанных антител в качестве терапевтических агентов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложены антитела, специфичные в отношении CD112R, для эффективного восстановления иммунной активности против раковых клеток, сверхэкспрессирующих нектин-2, и для лечения рака в качестве самостоятельного лечения или в комбинации с другими видами терапии, например, с

20 дополнительными ингибиторами иммунных контрольных точек. Согласно некоторым вариантам реализации антитела, описанные в настоящей заявке, предназначены для применения в лечении вирусных инфекций.

Согласно настоящему изобретению также предложены гуманизированные антитела, специфичные в отношении CD112R человека. Предпочтительно антитела согласно настоящему изобретению являются гуманизированными, что позволяет избежать риска нежелательного иммунного ответа на антитела, и, следовательно, безопасны для применения *in vivo* у человека.

В следующем описании изложены некоторые конкретные детали, чтобы обеспечить полное понимание различных вариантов реализации. Однако специалисту в данной области техники будет понятно, что предложенные варианты реализации могут быть

осуществлены на практике без этих деталей. Если контекст не требует иного, во всем описании и нижеследующей формуле изобретения слово «содержать» и его варианты, такие как «содержит» и «содержащий», должны толковаться в открытом, включительном смысле, то есть как «включая, но не ограничиваясь этим». В настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения термины в единственном числе (соотв. «а», «an» и «the» в исходном тексте на английском языке) включают их эквиваленты во множественном числе, если иное явным образом не следует из контекста. Следует также отметить, что термин «или» обычно используется в его значении, включающем «и/или», если из содержания явно не следует иное. Кроме того, заголовки, приведенные в настоящей заявке, предназначены только для удобства и не интерпретируют объем или значение заявленных вариантов реализации. В настоящей заявке термин «приблизительно» относится к количеству, которое приближается к указанному количеству на 10% или менее.

Термин «CD112R» или «PVRIG» в контексте настоящей заявки относится к человеческому рецептору клеточной поверхности для нектина-2, также известному как C7orf15. PVRIG означает родственный рецептору полиовируса белок, содержащий домен иммуноглобулина. Белок после взаимодействия с нектином-2 ингибирует пролиферацию Т-клеток. Примерный белок или ген CD112R, кодирующий белок в соответствии с настоящим изобретением, представлен под обозначениями или номерами доступа SwissPort, UniPort и GenBank: идентификатор гена: 79037, Q6DKI7, D6W5U9, Q9BVK3.

Антитела или их фрагмент в соответствии с настоящим изобретением связываются с эпитопом в CD112R. В частности, антитела связываются с эпитопом в эктодомене (внеклеточной части) белка CD112R.

Для создания исходных МАТ согласно настоящему изобретению был получен и очищен рекомбинантный слитый белок, содержащий внеклеточную часть CD112R человека и мышиную область Fc белка IgG в качестве носителя. Полученный слитый белок hCD112R–Fc использовали в качестве иммуногена. Мышам BALB/c вводили путем инъекции 50 мкг иммуногена в полном адьюванте Фрейнда, а через 2 недели вводили бустерную инъекцию с использованием неполного адьюванта Фрейнда. Через 2 недели сыворотки мышей подвергали скринингу на титр антител с использованием ИФА. Мыши с наилучшими ответами получали дополнительную бустерную инъекцию иммуногена в ФСБ. Через три дня собирали клетки селезенки и после лизиса эритроцитов сливали с клетками миеломы SP2/0. Клетки высевали в 20% среду RPMI 1640, содержащую гипоксантин, аминоптерин и тимидин, для селекции гибридомы и проводили скрининг на секрецию МАТ с использованием ИФА. Положительные клеточные линии, то есть клетки,

секретирующие МАТ, которые распознают hCD112R-Fc, были дополнительно отобраны для разработки продукта, который будет иметь следующие отличительные характеристики: а) отсутствие перекрестной реактивности с другими лигандами родственных рецепторов иммунных клеток (например, DNAM1 и TIGIT); б) сильное связывание с молекулой нативного зрелого CD112R человека, экспрессируемого на поверхности живых клеток.

Для гуманизации отобранных клонов антитела для тяжелой цепи был выбран каркас зародышевой линии IGHV1-69*10, и для каркаса легкой цепи был выбран IGKV4-1*01. Оба очень хорошо представлены в зародышевой линии человека, что дополнительно подтверждается высоким титром экспрессии полученных гуманизированных вариантов.

CD112R служит в качестве антигена для антител, описанных в настоящей заявке. Термин «антиген» в контексте настоящей заявки относится к молекуле или части молекулы, способной вызывать образование антитела и специфично связываемой антителом. Антиген может иметь один или более эпитопов. Упомянутое выше специфичное связывание означает, что антиген будет взаимодействовать высокоселективным образом со своим соответствующим антителом, а не с множеством других антител, которые могут быть индуцированы другими антигенами. Антиген в соответствии с некоторыми вариантами реализации настоящего изобретения представляет собой белок CD112R или его иммуногенную часть.

Аффинность связывания может быть количественно оценена с использованием известных методов, таких как поверхностный плазмонный резонанс (SPR) (описанный в Scarano S, Mascini M, Turner AP, Minunni M. Surface plasmon resonance imaging for affinity-based biosensors. Biosens Bioelectron. 2010, 25: 957-66), и может быть рассчитана с использованием, например, константы диссоциации, K_d , где более низкая K_d отражает более высокую аффинность.

Антитела или иммуноглобулины содержат две тяжелые цепи, связанные вместе дисульфидными связями, и две легкие цепи, причем каждая легкая цепь связана с соответствующей тяжелой цепью дисульфидными связями с образованием Y-образной структуры. Протеолитическое расщепление антитела дает домены Fv (вариабельный фрагмент) и Fc (кристаллизуемый фрагмент). Антигенсвязывающие домены, Fab, включают области, в которых полипептидная последовательность варьируется. Термин $F(ab)_2$ означает два плеча Fab, соединенных дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь имеет на одном конце вариабельный домен (V_H), за которым следует ряд константных доменов (C_H). Каждая легкая цепь имеет вариабельный домен (V_L) на одном конце и константный домен (C_L) на другом своем конце, причем вариабельный домен

легкой цепи находится рядом с переменным доменом тяжелой цепи, а константный домен легкой цепи находится рядом с первым константным доменом тяжелой цепи (CH1). Переменные домены каждой пары легкой и тяжелой цепей образуют антигенсвязывающий сайт. Домены на легкой и тяжелой цепях имеют одинаковую общую
5 структуру, и каждый домен содержит четыре каркасные области, последовательности которых относительно консервативны, к которым присоединяются три гиперпеременных домена, известных как определяющие комплементарность участки (CDR 1-3). Эти домены вносят вклад в специфичность и аффинность антигенсвязывающего сайта.

10 Изотип тяжелой цепи (гамма, альфа, дельта, эpsilon или мю) определяет класс иммуноглобулина (IgG, IgA, IgD, IgE или IgM, соответственно). Легкая цепь может иметь один из двух изотипов (каппа, к или лямбда, λ). Оба изотипа встречаются во всех классах антител.

15 Термин «антитело» используется в самом широком смысле и включает моноклональные антитела (включая полноразмерные или интактные моноклональные антитела), поликлональные антитела, поливалентные антитела, химерные антитела, гуманизированные антитела и фрагменты антител, достаточно длинные, чтобы проявлять желаемую биологическую активность, а именно связывание с CD112R человека.

20 Антитело или антитела в соответствии с настоящим изобретением включают интактные антитела, такие как поликлональные антитела или моноклональные антитела (MAT), а также их протеолитические фрагменты, такие как фрагменты Fab или F(ab')₂. Одноцепочечные антитела (например, scFv) входят в объем настоящего изобретения.

Фрагменты антител

25 «Фрагменты антител» содержат только часть интактного антитела, обычно включающую антигенсвязывающий сайт интактного антитела и, таким образом, сохраняющую способность связывать антиген. Примеры фрагментов антител, охватываемых настоящим определением, включают: (i) фрагмент Fab, имеющий домены VL, CL, VH и CH1; (ii) фрагмент Fab, представляющий собой фрагмент Fab, имеющий один или более остатков цистеина на С-конце домена CH1; (iii) фрагмент Fd, имеющий
30 домены VH и CH1; (iv) фрагмент Fd, имеющий домены VH и CH1 и один или более остатков цистеина на С-конце домена CH1; (v) фрагмент Fv, имеющий домены VL и VH одного плеча антитела; (vi) фрагмент dAb (Ward et al., Nature 1989, 341, 544-546), состоящий из домена VH; (vii) выделенные области CDR; (viii) фрагменты F(ab)₂, двухвалентный фрагмент, включающий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным
35 мостиком в шарнирной области; (ix) молекулы одноцепочечных антител (например,

одноцепочечный Fv; scFv) (Bird et al., Science 1988, 242, 423-426; и Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 1988, 85, 5879-5883); (x) «диатела» с двумя антигенсвязывающими сайтами, содержащими переменный домен тяжелой цепи (VH), связанный с переменным доменом легкой цепи (VL), в одной и той же полипептидной цепи (см., например, EP 404097; WO 93/11161; и Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90, 6444-6448); (xi) «линейные антитела», содержащие пару последовательно расположенных сегментов Fd (VH-CH1-VH-CH1), которые вместе с комплементарными полипептидами легкой цепи образуют пару антигенсвязывающих областей (Zapata et al. Protein Eng., 1995, 8, 1057-1062; и патент США № 5,641,870).

Были разработаны различные методики получения фрагментов антител. Традиционно эти фрагменты получали путем протеолитического расщепления интактных антител (см., например, Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992) и Brennan et al., Science, 229:81 (1985)). Однако в настоящее время эти фрагменты можно непосредственно продуцировать с помощью рекомбинантных клеток-хозяев. Например, фрагменты антител могут быть выделены из фаговых библиотек антител. В качестве альтернативы, фрагменты Fab-SH могут быть непосредственно выделены из *E. coli* и химически связаны с образованием фрагментов F(ab)₂ (Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)). Согласно другому подходу фрагменты F(ab)₂ могут быть выделены непосредственно из культуры рекомбинантных клеток-хозяев. Другие методики получения фрагментов антител будут понятны квалифицированному специалисту. Согласно другим вариантам реализации предпочтительное антитело представляет собой одноцепочечный фрагмент Fv (scFv).

Одноцепочечные антитела могут представлять собой одноцепочечные составные полипептиды, обладающие способностью связывать антиген и содержащие аминокислотные последовательности, гомологичные или аналогичные переменным областям легкой и тяжелой цепи иммуноглобулина, т. е. связанные V_H-V_L или одноцепочечный Fv (scFv). Методики получения одноцепочечных антител (патент США № 4,946,778) могут быть адаптированы для получения одноцепочечных антител к CD112R.

Термин «моноклональное антитело» (МАТ) в контексте настоящей заявки относится к антителу, полученному из популяции по существу однородных антител, т. е. отдельные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными, за исключением возможных природных мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела обладают высокой специфичностью и направлены против одного антигена. Кроме того, в отличие от препаратов поликлональных антител, которые

обычно включают разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одной детерминанты на антигене. Определение «моноклональный» не должно толковаться как требующее получения антитела каким-либо конкретным способом. МАТ могут быть получены способами, известными специалистам в данной области техники. Например, моноклональные антитела для применения согласно настоящему изобретению могут быть получены гибридным методом, впервые описанным Kohler et al., Nature 1975, 256, 495, или могут быть получены методами рекомбинантной ДНК (см., например, патент США № 4,816,567). Моноклональные антитела также могут быть выделены из фаговых библиотек антител с использованием методик, описанных, например, в Clackson et al., Nature 1991, 352, 624-628 или Marks et al., J. Mol. Biol., 1991, 222:581-597.

МАТ согласно настоящему изобретению могут принадлежать к любому классу иммуноглобулинов, включая IgG, IgM, IgE, IgA и IgD.

Также рассматриваются антиидиотипические антитела, обладающие специфической иммунореактивностью по отношению к гипервариабельным областям антитела согласно настоящему изобретению.

В соответствии с аспектом настоящего изобретения предложено антитело или фрагмент указанного антитела, содержащий набор из шести последовательностей CDR, выбранных из группы, состоящей из:

i. трех определяющих комплементарность участков (CDR) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 28, и трех CDR вариабельной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 26, или их аналога или производного, имеющего по меньшей мере 90% идентичности последовательности с указанной последовательностью антитела или фрагмента; и

ii. трех CDR вариабельной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 21, и трех CDR вариабельной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 23, или их аналога или производного, имеющего по меньшей мере 90% идентичности последовательности с указанной последовательностью антитела или фрагмента.

Идентичность последовательностей относится к проценту аминокислот или нуклеотидов, которые точно совпадают в двух разных последовательностях. Сходство последовательностей допускает определение консервативной замены аминокислот как идентичных аминокислот. Полинуклеотидные последовательности, описанные в данной заявке, могут быть оптимизированы по кодонам для экспрессии в конкретных клетках, таких как клетки человека. Оптимизация кодонов не изменяет кодируемые

аминокислотные последовательности цепи антитела, но может, например, увеличивать экспрессию в клетках.

Согласно настоящему изобретению также предложены консервативные аминокислотные варианты молекул антител в соответствии с настоящим изобретением.

5 Также могут быть получены варианты в соответствии с настоящим изобретением, сохраняющие общую молекулярную структуру кодируемых белков. Учитывая свойства отдельных аминокислот, составляющих раскрытые белковые продукты, специалист может определить необходимость некоторых целесообразных замен. Аминокислотные замены, т.е. «консервативные замены», могут быть сделаны, например, на основе сходства
10 полярности, заряда, растворимости, гидрофобности, гидрофильности и/или амфипатической природы задействованных остатков. В контексте настоящей заявки термин «аналог антитела» относится к антителу, полученному из другого антитела посредством одной или более консервативных аминокислотных замен.

В контексте настоящей заявки термин «вариант антитела» относится к любой
15 молекуле, содержащей антитело согласно настоящему изобретению. Например, вариантом антитела считаются слитые белки, в которых антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связаны с другим химическим структурным элементом.

Аналоги и варианты последовательностей антител также входят в объем настоящей заявки. Они включают, не ограничиваясь перечисленным, консервативные и
20 неконсервативные замены, инсерции и делеции аминокислот в последовательности. Такая модификация и получаемый в результате аналог или вариант антитела входят в объем настоящего изобретения при условии, что они придают или даже улучшают связывание антитела с CD112R человека.

Консервативные замены аминокислот, известные специалистам в данной области
25 техники, входят в объем настоящего изобретения. Консервативные аминокислотные замены включают замену одной аминокислоты другой, имеющей тот же тип функциональной группы или боковой цепи, например, алифатический, ароматический, положительно заряженный, отрицательно заряженный. Эти замены могут повысить пероральную биодоступность, проникновение и нацеливание на конкретные популяции
30 клеток, иммуногенность и т. п. Специалист поймет, что отдельные замены, делеции или добавления к пептидной, полипептидной или белковой последовательности, которые приводят к изменению, добавлению или удалению одной аминокислоты или небольшого процента аминокислот в кодируемой последовательности, представляют собой «консервативно модифицированный вариант», если изменение приводит к замене
35 аминокислоты на химически схожую аминокислоту. Таблицы консервативных замен, в

которых приведены функционально схожие аминокислоты, хорошо известны в данной области техники. Например, согласно одной из таблиц, известных в данной области техники, каждая из следующих шести групп содержит аминокислоты, которые являются консервативными заменами друг друга:

- 1) аланин (A), серин (S), треонин (T);
- 2) аспарагиновая кислота (D), глутаминовая кислота (E);
- 3) аспарагин (N), глутамин (Q);
- 4) аргинин (R), лизин (K);
- 5) изолейцин (I), лейцин (L), метионин (M), валин (V); и
- 6) фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W).

Следует подчеркнуть, что последовательности вариантных цепей определяют методами секвенирования с использованием специфических праймеров. Различные методы секвенирования, применяемые на одной и той же последовательности, могут приводить к несколько различающимся последовательностям из-за технических проблем и использования разных праймеров, особенно на концах последовательности.

Идентификацию или определение CDR из конкретной вариабельной последовательности тяжелой или легкой цепи обычно осуществляют с помощью одного из нескольких методов, известных в данной области техники. Например, такое определение выполняют в соответствии с Kabat (Wu T.T and Kabat E.A., *J Exp Med*, 1970; 132:211–50), Chothia и IMGT (Lefranc M-P, et al., *Dev Comp Immunol*, 2003, 27:55-77).

В случаях использования термина «CDR, имеющий последовательность» или аналогичного термина он включает варианты, в которых CDR содержит указанные последовательности, а также варианты, в которых CDR состоит из указанной последовательности.

Специфичность антитела в отношении антигена обусловлена гипервариабельной областью (HVR), а именно уникальными последовательностями CDR как легкой, так и тяжелой цепей, которые вместе образуют антигенсвязывающий сайт.

Термины «определяющий комплементарность участок» и «CDR», которые являются синонимами «гипервариабельной области» или «HVR», известны в данной области техники как относящиеся к несмежным последовательностям аминокислот в вариабельных областях антитела, которые придают специфичность в отношении антигена и/или аффинность связывания. В целом, существуют три CDR в каждой вариабельной области тяжелой цепи (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) и три CDR в каждой вариабельной области легкой цепи (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3). «Каркасные участки» и «FR» известны в данной области техники как относящиеся к не-CDR частям вариабельных областей

тяжелой и легкой цепей. В целом, существуют четыре FR в каждой полноразмерной
вариабельной области тяжелой цепи (FR-H1, FR-H2, FR-H3 и FR-H4) и четыре FR в
каждой полноразмерной вариабельной области легкой цепи (FR-L1, FR-L2, FR-L3 и FR-
L4). Точные границы аминокислотных последовательностей конкретного CDR или FR
5 могут быть легко определены с использованием любой из ряда хорошо известных схем,
включая те, которые описаны Kabat et al. (1991), «Sequences of Proteins of Immunological
Interest», 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (схема
нумерации «Kabat»), Al-Lazikani et al., (1997) *JMB* 273,927-948 (схема нумерации
«Chothia»); MacCallum et al., *J. Mol. Biol.* 262:732-745 (1996), «Antibody-antigen interactions:
10 Contact analysis and binding site topography», *J. Mol. Biol.* 262, 732-745. (схема нумерации
«Contact»); Lefranc MP et al., «IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell
receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains», *Dev Comp Immunol*, 2003
Jan;27(1):55-77 (схема нумерации «IMGT»); Honegger A and Plückthun A, «Yet another
numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis
15 tool», *J Mol Biol*, 2001 Jun 8;309(3):657-70, (схема нумерации «Aho»); и Whitelegg NR and
Rees AR, «WAM: an improved algorithm for modelling antibodies on the WEB», *Protein
Eng.* 2000 Dec;13(12):819-24 (схема нумерации «AbM»). Согласно определенным
вариантам реализации CDR антител, описанных в настоящей заявке, могут быть
определены методом, выбранным из Kabat, Chothia, IMGT, Aho, AbM или их комбинаций.

20 Границы конкретного CDR или FR могут варьироваться в зависимости от схемы,
используемой для идентификации. Например, схема Kabat основана на структурных
выравниваниях, в то время как схема Chothia основана на структурной информации.
Нумерация как для схемы Kabat, так и для схемы Chothia основана на наиболее
распространенных длинах последовательности области антитела со вставками,
25 размещенными буквами вставки, например, «30a», и делециями, появляющимися в
некоторых антителах. Эти две схемы размещают определенные вставки и делеции
(«инделы») в разных положениях, что приводит к различающейся нумерации. Схема
Contact основана на анализе сложных кристаллических структур и во многом аналогична
схеме нумерации Chothia.

30 Изменения (например, замены) могут быть сделаны в CDR, например, для
улучшения аффинности антитела. Такие изменения могут быть внесены в кодоны,
кодирующие CDR, с высокой скоростью мутации во время соматического созревания (см.,
например, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)), и полученный вариант
может быть протестирован на аффинность связывания. Созревание аффинности
35 (например, с использованием подверженной ошибкам ПЦР, перестановки цепей,

рандомизации CDR или олигонуклеотид-направленного мутагенеза) можно применять для улучшения аффинности антитела (см., например, Hoogenboom et al. в *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (2001)). Остатки CDR, участвующие в связывании антигена, могут быть конкретно идентифицированы, например, с использованием мутагенеза с аланиновым сканированием или моделирования (см., например, Cunningham and Wells Science, 244:1081-1085 (1989)). CDR-H3 и CDR-L3, в частности, часто являются мишенью. В качестве альтернативны, или дополнительно, кристаллическая структура комплекса антиген-антитело используется для идентификации точек контакта между антителом и антигеном. Такие контактные остатки и соседние остатки могут быть мишенью или устранены в качестве кандидатов для замены. Варианты могут быть подвергнуты скринингу для определения того, имеют ли они желаемые свойства.

Термины «молекула, имеющая антигенсвязывающую часть антитела» и «антигенсвязывающие фрагменты» в контексте настоящей заявки подразумевают не только интактные молекулы иммуноглобулинов любого изотипа и продуцируемые любой линией клеток животных или микроорганизмом, но также их антигенсвязывающую реакционноспособную часть, включая, но не ограничиваясь перечисленным, фрагмент Fab, фрагмент Fab', фрагмент F(ab')₂, вариабельную часть их тяжелой и/или легкой цепей, Fab мини-антител (см., например, WO 93/15210, заявку на патент США № 08/256,790, WO 96/13583, заявку на патент США № 08/817,788, WO 96/37621, заявку на патент США № 08/999,554), и одноцепочечные антитела, содержащие такую реакционноспособную часть, а также любой другой тип молекулы, в которую физически вставлена такая реакционноспособная часть антитела. Такие молекулы могут быть получены с помощью любой известной методики, включая, не ограничиваясь перечисленным, ферментативное расщепление, пептидный синтез или рекомбинантные методики.

Антитела в данной заявке конкретно включают «химерные» антитела, в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, происходящих из определенного вида или принадлежащих к определенному классу или подклассу антител, в то время как остальная часть цепи (цепей) идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, происходящих из другого вида или принадлежащих к другому классу или подклассу антител, а также фрагменты таких антител при условии, что они проявляют желаемую биологическую активность (патент США № 4,816,567; и Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)). Кроме того, может быть осуществлена прививка определяющего комплементарность участка (CDR) для изменения определенных свойств молекулы антитела, включая аффинность или специфичность. Антитела, в которых

каркасные остатки вариабельной области по существу происходят из антитела человека (называемого акцепторным антителом), а CDR по существу происходят из мышиногo антитела (называемого донорным антителом), также называются гуманизированными антителами. Химерные антитела в основном используются для уменьшения иммуногенности при применении и для увеличения выхода при получении, например, когда мышинные МАТ имеют более высокий выход из гибридом, но более высокую иммуногенность у людей, так что используются химерные МАТ человек/мышь. Химерные антитела и способы их получения известны в данной области техники (например, РСТ заявки на патент WO 86/01533, WO 90/07861, WO 92/22653 и патенты США № 5,693,762, 5,693,761, 5,585,089, 5,530,101 и 5,225,539).

В соответствии с некоторыми вариантами реализации антитело представляет собой моноклональное антитело.

В соответствии с некоторыми конкретными вариантами реализации моноклональное антитело представляет собой химерное моноклональное антитело.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации химерное антитело содержит константные области человека.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации константные области человека химерного антитела выбраны из группы, состоящей из: IgG1 человека, IgG2 человека, IgG3 человека и IgG4 человека.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации константные области человека химерного антитела выбраны из группы, состоящей из: IgG1 человека.

В соответствии с конкретным вариантом реализации предложено химерное моноклональное антитело, распознающее CD112R человека, содержащее:

i. набор из шести CDR, причем: последовательность CDR1 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 7; последовательность CDR2 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 8; последовательность CDR3 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 3; последовательность CDR1 легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 4; последовательность CDR2 легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 5; и последовательность CDR3 легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 6; или

ii. набор из шести CDR, причем: последовательность CDR1 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 7; последовательность CDR2 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 12; последовательность CDR3 тяжелой цепи представляет

собой SEQ ID NO: 3; последовательность CDR1 легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 11; последовательность CDR2 легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 5; и последовательность CDR3 легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 6.

5 Согласно некоторым вариантам реализации антитела, предложенное в настоящей заявке, может быть дополнительно модифицировано таким образом, чтобы содержать дополнительные небелковые фрагменты, которые известны и доступны. Фрагменты, подходящие для дериватизации антитела, включают, но не ограничиваются ими, водорастворимые полимеры. Неограничивающие примеры водорастворимых полимеров
10 включают, но не ограничиваются перечисленными, полиэтиленгликоль (ПЭГ), сополимеры этиленгликоля/пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлозу, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, поли-1,3-диоксолан, поли-1,3,6-триоксан, сополимер этилена/малеинового ангидрида, полиаминокислоты (либо гомополимеры, либо статистические сополимеры), и декстран или поли(н-
15 винилпирролидон)полиэтиленгликоль, гомополимеры полипропиленгликоля, сополимеры оксида полипропилена/оксида этилена, полиоксиэтилированные полиолы (например, глицерин), поливиниловый спирт и их смеси. Полиэтиленгликольпропиональдегид может иметь преимущества при изготовлении из-за его стабильности в воде. Полимер может иметь любую молекулярную массу и может быть разветвленным или неразветвленным.
20 Число полимеров, присоединенных к антителу, может варьироваться, и если присоединены два или более полимеров, они могут представлять собой одинаковые или различные молекулы.

Антитела, описанные в настоящей заявке, могут кодироваться нуклеиновой кислотой. Нуклеиновая кислота представляет собой тип полинуклеотида, содержащий два
25 или более нуклеотидных оснований. Согласно определенным вариантам реализации нуклеиновая кислота представляет собой компонент вектора, который может быть использован для переноса полипептида, кодирующего полинуклеотид, в клетку. В настоящей заявке термин «вектор» относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Один
30 тип вектора представляет собой геномно-интегрированный вектор или «интегрированный вектор», который может интегрироваться в хромосомную ДНК клетки-хозяина. Другой тип вектора представляет собой «эписомный» вектор, например, нуклеиновую кислоту, способную к внехромосомной репликации. Векторы, способные контролировать экспрессию генов, с которыми они функционально связаны, называются в настоящей
35 заявке «векторами экспрессии». Подходящие векторы включают плазмиды,

бактериальные искусственные хромосомы, дрожжевые искусственные хромосомы, вирусные векторы и тому подобное. В векторах экспрессии регуляторные элементы, такие как промоторы, энхансеры, сигналы полиаденилирования, для применения в контроле транскрипции могут быть получены из генов млекопитающих, микроорганизмов, вирусов или насекомых. Дополнительно может быть включена способность к репликации в хозяине, обычно обеспечиваемая точкой начала репликации, и ген отбора для облегчения распознавания трансформантов. Могут применяться векторы, полученные из вирусов, таких как лентивирусы, ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы и т.п. Плазмидные векторы могут быть линейаризованы для интеграции в хромосомное положение. Векторы могут содержать последовательности, которые направляют сайт-специфичную интеграцию в определенное местоположение или ограниченный набор сайтов в геноме (например, рекомбинация AttP-AttB). Кроме того, векторы могут содержать последовательности, полученные из транспонируемых элементов.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, описанные в настоящей заявке, могут применяться для инфицирования, трансфекции, трансформации или иного превращения подходящей клетки в трансгенную для нуклеиновой кислоты, что позволяет получать антитела для коммерческого или терапевтического применения. Стандартные клеточные линии и способы получения антител из крупномасштабной клеточной культуры известны в данной области техники. Согласно определенным вариантам реализации клетка представляет собой эукариотическую клетку. Согласно определенным вариантам реализации эукариотическая клетка представляет собой клетку млекопитающего. Согласно определенным вариантам реализации клетка млекопитающего представляет собой клеточную линию, пригодную для получения антител, представляющую собой клетку яичника китайского хомяка (CHO), клетку миеломы мыши NS0 или клетку PER.C6[®]. Согласно определенным вариантам реализации нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, интегрируют в геномный локус клетки, пригодной для получения антител. Согласно определенным вариантам реализации в настоящей заявке описан способ получения антитела, включающий культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, в условиях *in vitro*, достаточных для обеспечения продукции и секреции указанного антитела.

В настоящей заявке также описаны способы получения МАТ и фрагментов, специфичных в отношении CD112R, согласно настоящему изобретению. Такие способы включают инкубацию клетки или клеточной линии, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, в среде для культивирования клеток в условиях, достаточных для обеспечения экспрессии и секреции антитела, и дальнейший сбор антитела из среды для

культивирования клеток. Сбор может дополнительно включать одну или более стадий очистки для удаления живых клеток, клеточного дебриса, белков или полипептидов, не являющихся антителами, нежелательных солей, буферов и компонентов среды. Согласно определенным вариантам реализации дополнительная стадия(и) очистки включает

5 центрифугирование, ультрацентрифугирование, очистку на белке А, белке G, белке А/G или белке L и/или ионообменную хроматографию.

В соответствии с одним аспектом настоящего изобретения предложено МАТ или его фрагмент, содержащий по меньшей мере антигенсвязывающую часть, который специфично связывается с CD112R человека, причем указанное антитело или его

10 фрагмент обладает аффинностью в отношении CD112R человека, составляющей по меньшей мере $0,5 \times 10^{-9}$ М.

Согласно определенным вариантам реализации ЭК₅₀ гуманизированного МАТ или его антигенсвязывающего фрагмента для связывания CD112R человека составляет менее приблизительно 0,5 нМ, 0,1 нМ, 0,05 нМ или 0,01 нМ.

Полумаксимальная эффективная концентрация (ЭК₅₀) относится к концентрации антитела, которая индуцирует ответ, величина которого находится посередине между исходным уровнем и максимумом после указанного времени воздействия.

15

В соответствии с некоторыми вариантами реализации МАТ или фрагмент МАТ содержит набор из шести последовательностей CDR, выбранных из группы, состоящей из:

20 i. трех определяющих комплементарность участков (CDR) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 28, и трех CDR вариабельной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 26, или их аналога или производного, имеющего по меньшей мере 90% идентичности последовательности с указанной последовательностью антитела или фрагмента; и

25 ii. трех CDR вариабельной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 21, и трех CDR вариабельной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 23, или их аналога или производного, имеющего по меньшей мере 90% идентичности последовательности с указанной последовательностью антитела или фрагмента.

30 В соответствии с некоторыми конкретными вариантами реализации МАТ или фрагмент содержит последовательность CDR1 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SY, CDR2 тяжелой цепи, содержащий последовательность YPGSYIP (SEQ ID NO: 2), CDR3 тяжелой цепи, содержащий последовательность GYFDV (SEQ ID NO: 3), CDR1 легкой цепи, содержащий

35 последовательность KSSQSLLXSGNQKNYLA (SEQ ID NO: 4), где X обозначает N или S,

CDR2 легкой цепи, содержащий последовательность GASTRES (SEQ ID NO: 5), и CDR3 легкой цепи, содержащий последовательность QNDHSYPYT (SEQ ID NO: 6), или их аналоги, содержащие не более 5% аминокислотных замен, делеций и/или инсерций в последовательности гипервариабельной области (HVR).

5 В соответствии с некоторыми конкретными вариантами реализации МАТ или фрагмент содержит последовательность CDR1 тяжелой цепи, состоящую из последовательности GYX₁FX₂SY (SEQ ID NO: 1), где X₁ обозначает N, D, A, Q, S или T; и X₂ обозначает T или A, или SYWIN (SEQ ID NO: 7), CDR2 тяжелой цепи состоит из последовательности YPGSYIP (SEQ ID NO: 2), CDR3 тяжелой цепи состоит из
10 последовательности GYFDV (SEQ ID NO: 3), CDR1 легкой цепи состоит из последовательности KSSQSLLXSGNQKNYLA (SEQ ID NO: 4), где X обозначает N или S, CDR2 легкой цепи состоит из последовательности GASTRES (SEQ ID NO: 5), и CDR3 легкой цепи состоит из последовательности QNDHSYPYT (SEQ ID NO: 6).

В соответствии с некоторыми вариантами реализации антитела представляют собой
15 гуманизированные антитела.

«Гуманизированное» антитело представляет собой антитело, в котором все или по существу все аминокислотные остатки CDR происходят из нечеловеческого CDR, и все или по существу все аминокислотные остатки FR происходят из FR человека. Гуманизированное антитело необязательно может включать по меньшей мере часть
20 константной области антитела, происходящей из антитела человека. «Гуманизированная форма» антитела, не являющегося человеческим, относится к варианту антитела, не являющегося человеческим, который подвергся гуманизации, как правило, для снижения иммуногенности для человека, сохраняя при этом специфичность и аффинность исходного антитела, не являющегося человеческим. В соответствии с некоторыми
25 вариантами реализации некоторые остатки FR в гуманизированном антителе замещены соответствующими остатками из антитела, не являющегося человеческим (например, антитела, из которого получены остатки CDR), например, для восстановления или улучшения специфичности или аффинности антитела.

«Антитело человека» представляет собой антитело с последовательностью
30 аминокислот, соответствующей последовательности антитела, продуцируемого в организме человека или клеткой человека, или источником, отличным от человека, в котором используются репертуары антител человека или другие последовательности, кодирующие антитело человека, включая библиотеки антител человека. Термин исключает гуманизированные формы антител, не являющихся человеческими,
35 содержащих нечеловеческие антигенсвязывающие области, такие как те, в которых все

или по существу все CDR являются нечеловеческими.

Фармакология и способы лечения

В фармацевтических и лекарственных составах активный агент предпочтительно используется вместе с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями и необязательно любыми другими терапевтическими ингредиентами. Носитель(и) должен быть фармацевтически приемлемым в том смысле, что он должен быть совместимым с другими ингредиентами препарата и не оказывать чрезмерно пагубного действия на его реципиента. Активный агент обеспечивается в количестве, эффективном для достижения желаемого фармакологического эффекта, как описано выше, и в количестве, подходящем для достижения желаемого воздействия.

Обычно антитела, их фрагменты и конъюгаты согласно настоящему изобретению, содержащие антигенсвязывающую часть антитела или содержащие другой полипептид, включая пептидомиметик, будут суспендированы в стерильном физиологическом растворе для применения в терапевтических целях. В качестве альтернативы фармацевтические композиции могут быть изготовлены с обеспечением контроля высвобождения активного ингредиента (молекулы, содержащей антигенсвязывающую часть антитела) или продления его присутствия в организме пациента. Известны многочисленные подходящие системы доставки лекарственных средств, которые включают, например, имплантируемые системы для высвобождения лекарственных средств, гидрогели, гидроксиметилцеллюлозу, микрокапсулы, липосомы, микроэмульсии, микросферы и тому подобное. Препараты с контролируемым высвобождением могут быть приготовлены с использованием полимеров для образования комплекса с молекулой в соответствии с настоящим изобретением или ее адсорбции. Например, биосовместимые полимеры включают матриксы из сополимера этилена и винилацетата и матриксы из сополимера димера стеариновой кислоты и себадиновой кислоты полиангидридного типа. Скорость высвобождения молекулы в соответствии с настоящим изобретением, т.е. антитела или фрагмента антитела, из такого матрикса зависит от молекулярной массы молекулы, количества молекулы в матриксе и размера диспергированных частиц.

Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может быть введена любыми подходящими способами, например, внутривенно, перорально, местно, интраназально, подкожно, внутримышечно, внутриартериально, внутрисуставно, внутриочагово, внутриопухолево или парентерально. Обычно для доставки антител используют внутривенное (в/в) введение.

В соответствии с аспектом настоящего изобретения предложен способ лечения рака,

включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антитело или фрагмент указанного антитела, описанный в настоящей заявке.

В настоящей заявке термин «субъект», «индивидуум» или «пациент» относится к индивидуумам с диагнозом, подозрением на поражение или риском развития по меньшей мере одного заболевания, для лечения которого пригодны описанные композиции и способ. В соответствии с некоторыми вариантами реализации индивидуум представляет собой млекопитающее. В соответствии с некоторыми вариантами реализации млекопитающее представляет собой мышь, крысу, кролика, собаку, кошку, лошадь, корову, овцу, свинью, козу, ламу, альпаку или яка. В соответствии с некоторыми вариантами реализации индивидуум представляет собой человека.

Обычные специалисты в данной области техники поймут, что терапевтически эффективное количество молекулы в соответствии с настоящим изобретением будет зависеть, среди прочего, от схемы введения, единичной дозы вводимой молекулы, от того, вводится ли молекула в комбинации с другими терапевтическими агентами, иммунного статуса и состояния здоровья пациента, терапевтической активности вводимой молекулы, ее устойчивости в кровообращении и мнения лечащего врача.

В контексте настоящей заявки термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству лекарственного средства, эффективному для лечения заболевания или нарушения у млекопитающего. В случае рака терапевтически эффективное количество лекарственного средства может уменьшать количество раковых клеток; уменьшать размер опухоли; ингибировать (т. е. замедлять до некоторой степени и предпочтительно останавливать) инфильтрацию раковых клеток в периферические органы; ингибировать (т. е. замедлять до некоторой степени и предпочтительно останавливать) метастазирование опухоли; ингибировать, до некоторой степени, рост опухоли; и/или облегчать, до некоторой степени, один или более симптомов, ассоциированных с нарушением. В тех случаях, когда лекарственное средство может предотвращать рост и/или уничтожать существующие раковые клетки, оно может быть цитостатическим и/или цитотоксическим. Для терапии рака эффективность *in vivo* может быть измерена, например, путем оценки продолжительности выживаемости, времени до прогрессирования заболевания (ВДП), частоты ответов (ЧО), длительности ответа и/или качества жизни.

Рак, поддающийся лечению с помощью настоящего изобретения, включает, но не ограничивается перечисленным: карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкоз или лимфоидные злокачественные новообразования. Более конкретные примеры таких видов

рака включают плоскоклеточный рак, рак легкого (включая мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого и плоскоклеточную карциному легкого), рак брюшины, гепатоклеточный рак, желудочный рак или рак желудка (включая рак желудочно-кишечного тракта), рак поджелудочной железы, глиобластому, рак шейки матки, рак яичника, рак печени, рак мочевого пузыря, гепатому, рак молочной железы, рак ободочной кишки, колоректальный рак, карциному эндометрия или матки, карциному слюнной железы, рак почек или почечный рак, рак печени, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, карциному печени и различные типы рака головы и шеи, а также В-клеточную лимфому (включая низкоклеточную/фолликулярную неходжкинскую лимфому (НХЛ); мелкоклеточную лимфоцитарную (МЛ) НХЛ; среднезлокачественную/фолликулярную НХЛ; среднезлокачественную диффузную НХЛ; высококлеточную иммунобластную НХЛ; высококлеточную лимфобластную НХЛ; высококлеточную мелкоклеточную НХЛ с нерасщепленным ядром; НХЛ с массивным поражением; мантийноклеточную лимфому; СПИД-ассоциированную лимфому; и макроглобулинемию Вальденстрема); хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ); острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ); волосатоклеточный лейкоз; хронический миелобластный лейкоз; и посттрансплантационное лимфопролиферативное нарушение (ПТЛР), а также патологическую сосудистую пролиферацию, ассоциированную с факоматозами, отек (например, ассоциированный с опухолями головного мозга) и синдром Мейгса. Предпочтительно рак выбран из группы, состоящей из рака молочной железы, колоректального рака, ректального рака, немелкоклеточного рака легкого, неходжкинской лимфомы (НХЛ), почечно-клеточного рака, рака предстательной железы, рака печени, рака поджелудочной железы, саркомы мягких тканей, саркомы Капоши, нейроэндокринной карциномы, рака головы и шеи, меланомы, рака яичника, мезотелиомы и множественной миеломы. Раковые состояния, поддающиеся лечению согласно настоящему изобретению, включают разные виды метастатического рака.

Молекулы согласно настоящему изобретению в качестве активных ингредиентов растворяют, диспергируют или смешивают со вспомогательным веществом, которое, как хорошо известно, является фармацевтически приемлемым и совместимым с активным ингредиентом. Подходящими вспомогательными веществами являются, например, вода, физиологический раствор, фосфатно-солевой буфер (ФСБ), декстроза, глицерин, этанол или тому подобное, и их комбинации. Другие подходящие носители хорошо известны специалистам в данной области техники. Кроме того, при желании композиция может содержать незначительные количества дополнительных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, буферные агенты для регулировки pH.

Фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим изобретением может быть введена вместе или в комбинации с противоопухолевой композицией.

В настоящей заявке термин «комбинация» или «комбинированное лечение» может относиться либо к одновременному введению изделий, подлежащих комбинированию, либо к последовательному введению изделий, подлежащих комбинированию. Как описано в настоящей заявке, когда комбинация относится к последовательному введению изделий, изделия можно вводить в любом временном порядке.

Термин «лечение» в контексте настоящей заявки относится как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или превентивным мерам. Нуждающиеся в лечении включают тех, кто уже страдает нарушением, а также тех, у кого нарушение необходимо предотвратить.

Термин «рак» относится или описывает физиологическое состояние у млекопитающих, которое обычно характеризуется нерегулируемым ростом клеток. Примеры рака включают, не ограничиваясь перечисленным, карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкоз. Более конкретные примеры таких видов рака включают меланому, рак легкого, рак щитовидной железы, рак молочной железы, рак ободочной кишки, рак предстательной железы, рак печени, рак мочевого пузыря, рак почек, рак шейки матки, рак поджелудочной железы, лейкоз, лимфому, миелоидный рак, рак яичника, рак матки, саркому, рак желчных протоков или рак эндометрия.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации способ лечения рака включает введение фармацевтической композиции как части схемы лечения, включающей введение по меньшей мере одного дополнительного противоракового агента.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации противораковый агент выбран из группы, состоящей из антиметаболита, ингибитора митоза, таксана, ингибитора топоизомеразы, ингибитора топоизомеразы II, аспарагиназы, алкилирующего агента, противоопухолевого антибиотика и их комбинаций. Каждый возможный вариант представляет собой отдельный вариант реализации настоящего изобретения.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации антиметаболит выбран из группы, состоящей из цитарабина, флударабина, фторурацила, меркаптопурина, метотрексата, тиогуанина, гемцитабина и гидроксимочевина. В соответствии с некоторыми вариантами реализации ингибитор митоза выбран из группы, состоящей из винкристина, винбластина и винорелбина. В соответствии с некоторыми вариантами реализации ингибитор топоизомеразы выбран из группы, состоящей из топотекана и иринотекана. В соответствии с некоторыми вариантами реализации алкилирующий агент выбран из группы, состоящей из бусульфана, кармустина, ломустина, хлорамбуцила,

циклофосфамида, цисплатина, карбоплатина, ифосфамида, мехлорэтамину, мелфалану, тиотепу, дакарбазину и прокарбазину. В соответствии с некоторыми вариантами реализации противоопухолевый антибиотик выбран из группы, состоящей из блеомицина, дактиномицина, даунорубицина, доксорубицина, идарубицина, митомицина, митоксантрона и пликамицина. В соответствии с некоторыми вариантами реализации топоизомеразы II выбрана из группы, состоящей из этопозиды и тенипозиды. Каждый возможный вариант представляет собой отдельный вариант реализации настоящего изобретения.

В соответствии с некоторыми конкретными вариантами реализации дополнительный противораковый агент выбран из группы, состоящей из бевацизумаба, карбоплатина, циклофосфамида, доксорубицина гидрохлорида, гемцитабина гидрохлорида, топотекана гидрохлорида, тиотепы и их комбинаций. Каждый возможный вариант представляет собой отдельный вариант реализации настоящего изобретения.

Моноклональные антитела в соответствии с настоящим изобретением можно применять как часть комбинированной терапии по меньшей мере с одним противораковым агентом. В соответствии с некоторыми вариантами реализации дополнительный противораковый агент представляет собой иммуномодулятор, активированную лимфоцитарную клетку, ингибитор киназы или химиотерапевтический агент.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации противораковый агент представляет собой иммуномодулятор, будь то агонист или антагонист, такой как антитело к молекуле иммунной контрольной точки.

Блокада иммунных контрольных точек посредством иммунотерапии оказалась новым перспективным средством лечения рака. Пути иммунных контрольных точек состоят из ряда костимулирующих и ингибирующих молекул, которые работают согласованно, поддерживая аутоотолерантность и защищая ткани от повреждения иммунной системой в физиологических условиях. Опухоли используют определенные пути контрольных точек, чтобы уклоняться от иммунной системы. Таким образом, ингибирование таких путей стало многообещающей стратегией противоракового лечения.

Ипилимумаб, антитело к белку 4, ассоциированному с цитотоксическими Т-лимфоцитами (CTLA-4) (одобрено в 2011 г.), был первым иммунотерапевтическим агентом, который продемонстрировал положительные результаты в лечении пациентов, страдающих раком. Это антитело препятствует ингибирующим сигналам во время презентации антигена Т-клеткам. Пембролизумаб, антитело к белку запрограммированной клеточной смерти 1 (PD-1) (одобрено в 2014 г.), блокирует отрицательную

иммунорегуляторную передачу сигналов рецептором PD-1, экспрессируемым Т-клетками. Дополнительный агент против PD-1 был подан на одобрение надзорных органов в 2014 году для лечения немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ). В настоящее время проводятся активные исследования множества других иммунных контрольных точек, среди них: CEACAM1, NKG2A, B7-H3, B7-H4, VISTA, ген активации лимфоцитов-3 (LAG3), CD137, OX40 (также называемый CD134) и иммуноглобулиноподобные рецепторы клеток-киллеров (KIR).

В соответствии с некоторыми конкретными вариантами реализации иммуномодулятор выбран из группы, состоящей из: антитела, ингибирующего CTLA-4, антитела к человеческому белку запрограммированной гибели клеток 1 (PD-1), к PD-L1 и к PD-L2, активированной цитотоксической лимфоцитарной клетки, агента, активирующего лимфоциты, антитела к CEACAM, антитела к TIGIT и ингибитора сигнального пути RAF/MEK. Каждый возможный вариант представляет собой отдельный вариант реализации настоящего изобретения. В соответствии с некоторыми конкретными вариантами реализации дополнительный иммуномодулятор выбран из МАТ к PD-1, МАТ к PD-L1, МАТ к PD-L2, МАТ к CEACAM1, МАТ к CTLA-4, МАТ к TIGIT, МАТ к PVR, интерлейкина 2 (IL-2) или лимфокин-активированных клеток-киллеров (ЛАК).

Согласно определенным вариантам реализации ингибитор передачи сигналов PD-1 представляет собой антитело или его фрагмент, который связывается с PD-1. Согласно определенным вариантам реализации антитело или его фрагмент, который связывается с PD-1, представляет собой пембролизумаб, ниволумаб, AMP-514, тислелизумаб, спартализумаб или его PD-1-связывающий фрагмент. Согласно определенным вариантам реализации ингибитор сигнального пути PD-1 представляет собой антитело, которое специфично связывает PD-L1 или PD-L2. Согласно определенным вариантам реализации антитело, специфично связывающее PD-L1 или PD-L2, содержит дурвалумаб, атезолизумаб, авелумаб, BMS-936559 или FAZ053 или их PD-L1- или PD-L2-связывающий фрагмент. Согласно определенным вариантам реализации ингибитор передачи сигналов PD-1 содержит Fc-слитый белок, который связывает PD-1, PD-L1 или PD-L2. Согласно определенным вариантам реализации Fc-слитый белок содержит AMP-224 или его PD-1-связывающий фрагмент. Согласно определенным вариантам реализации ингибитор передачи сигналов PD-1 содержит низкомолекулярный ингибитор PD-1, PD-L1 или PD-L2. Согласно определенным вариантам реализации низкомолекулярный ингибитор передачи сигналов PD-1, PD-L1 или PD-L2 содержит один или более из: N-{2-[(2-метокси-6-[(2-метил[1,1'-бифенил]-3-ил)метокси]пиридин-3-

ил}метил)амино]этил}ацетамида (BMS 202); гидрохлорида (2-((3-цианобензил)окси)-4-

((3-(2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-ил)-2-метилбензил)окси)-5-метилбензил)-D-серина; (2R,4R)-1-(5-хлор-2-((3-цианобензил)окси)-4-((3-(2,3-дигидробензо[b][1,4]диоксин-6-ил)-2-метилбензил)окси)бензил)-4-гидроксипирролидин-2-карбоновой кислоты; 3-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-1-фенилиндола; 3-(4,6-дихлор-1,3,5-триазин-2-ил)-1-фенил-1h-индола; L-α-глутамин, N2,N6-бис(L-серил-L-аспарагинил-L-треонил-L-серил-L-α-глутамил-L-серил-L-фенилаланил)-L-лизил-L-фенилаланил-L-аргинил-L-валил-L-треонил-L-глутаминил-L-лейцил-L-аланил-L-пролил-L-лизил-L-аланил-L-глутаминил-L-изолейцил-L-лизила; (2S)-1-[[2,6-диметокси-4-[(2-метил[1,1'-бифенил]-3-ил)метокси]фенил]метил]-2-пиперидинкарбоновой кислоты; глицинамида, N-(2-меркаптоацетил)-L-фенилаланил-N-метил-L-аланил-L-аспарагинил-L-пролил-L-гистидил-L-лейцил-N-метилглицил-L-триптофил-L-серил-L-триптофил-N-метил-L-норлейцил-N-метил-L-норлейцил-L-аргинил-L-цистеинил-, циклического (1→14)-тиоэфира; или их производного или аналога.

В соответствии с другими вариантами реализации дополнительный противораковый агент представляет собой химиотерапевтический агент. Химиотерапевтический агент, который может быть введен вместе с антителом в соответствии с настоящим изобретением или отдельно, может содержать любой такой агент, известный в данной области техники, проявляющий противоопухолевую активность, включая, не ограничиваясь перечисленным: митоксантрон, ингибиторы топоизомеразы, веретённый яд из барвинка: винбластин, винкристин, винорелбин (таксол), паклитаксел, доцетаксел; алкилирующие агенты: мехлорэтамин, хлорамбуцил, циклофосфамид, мелфалан, ифосфамид; метотрексат; 6-меркаптопурин; 5-фторурацил, цитарабин, гемцитабин; подофиллотоксины: этопозид, иринотекан, топотекан, дакарбазин; антибиотики: доксорубин (адриамицин), блеомицин, митомицин; нитрозомочевина: кармустин (BCNU), ломустин, эпирубицин, идарубицин, даунорубицин; неорганические ионы: цисплатин, карбоплатин; интерферон, аспарагиназу; гормоны: тамоксифен, лейпролид, флутамид и мегестрола ацетат.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации химиотерапевтический агент выбран из алкилирующих агентов, антиметаболитов, аналогов фолиевой кислоты, аналогов пиримидина, аналогов пурина и родственных ингибиторов, алкалоидов барвинка, эпиподофиллотоксинов, антибиотиков, L-аспарагиназы, ингибитора топоизомеразы, интерферонов, координационных комплексов платины, антрацендиона, замещенной мочевины, производных метилгидразина, адренкортикального супрессора, адренкортикостероидов, прогестинов, эстрогенов, антиэстрогенов, андрогенов, антиандрогенов и аналога гонадотропин-рилизинг-гормона. В соответствии с другим

вариантом реализации химиотерапевтический агент выбран из группы, состоящей из 5-фторурацила (5-FU), лейковорина (LV), иринотекана, оксалиплатина, капецитабина, паклитаксела и доцетаксела. Можно применять один или более химиотерапевтических агентов.

5 В соответствии с некоторыми вариантами реализации фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим изобретением предназначена для применения в лечении рака или для применения в усилении иммунного ответа.

Термин «усиление иммунного ответа» относится к увеличению реакции иммунной системы и индукции или продлению ее памяти. Фармацевтическую композицию в соответствии с настоящим изобретением можно применять для стимуляции иммунной системы после вакцинации. Таким образом, в одном из вариантов реализации фармацевтическую композицию можно применять для улучшения вакцинации.

Согласно определенным вариантам реализации рак выбран из рака легкого, рака щитовидной железы, рака молочной железы, рака ободочной кишки, меланомы, рака предстательной железы, рака печени, рака мочевого пузыря, рака почек, рака шейки матки, рака поджелудочной железы, лейкоза, лимфомы, миелоидного рака, рака яичника, рака матки, саркомы, рака желчных протоков и рака из клеток эндометрия. Каждый возможный вариант представляет собой отдельный вариант реализации настоящего изобретения.

20 В соответствии с некоторыми вариантами реализации фармацевтическую композицию, содержащую по меньшей мере одно антитело или его фрагмент в соответствии с настоящим изобретением, и фармацевтическую композицию, содержащую дополнительный иммуномодулятор или ингибитор киназы, применяют в лечении рака путем раздельного введения.

25 В соответствии с еще одним аспектом настоящего изобретения предложен способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества антитела или фрагмента антитела в соответствии с настоящим изобретением.

Токсичность и терапевтическую эффективность композиций, описанных в настоящей заявке, можно определить с помощью стандартных фармацевтических процедур на клеточных культурах или у экспериментальных животных, например, путем определения ИК₅₀ (концентрации, которая обеспечивает 50% ингибирование) и максимальной переносимой дозы для соединения согласно настоящему изобретению. Данные, полученные в результате этих анализов клеточных культур и исследований на животных, могут быть использованы при разработке диапазона дозировок для применения

у людей. Дозировка может варьироваться в зависимости, среди прочего, от используемой лекарственной формы, выбранного режима дозирования, композиции агентов, используемых для лечения, и используемого пути введения, а также других значимых факторов. Точный состав, путь введения и дозировка могут быть выбраны индивидуальным врачом с учетом состояния пациента. В зависимости от тяжести и восприимчивости состояния, подлежащего лечению, введение доз также может представлять собой однократное введение композиции с медленным высвобождением, при этом курс лечения может продолжаться от нескольких дней до нескольких недель или до тех пор, пока не произойдет излечение или не будет достигнуто уменьшение патологического состояния. Количество композиции, подлежащей введению, безусловно, будет зависеть от субъекта, которого лечат, тяжести заболевания, способа введения, заключения лечащего врача и всех прочих значимых факторов.

«Выполнение введения» или «введение» вещества, соединения или агента субъекту можно осуществлять с использованием одного из множества методов, известных специалистам в данной области техники. Например, соединение или агент могут быть введены энтерально или парентерально. Энтеральное введение относится к введению через желудочно-кишечный тракт, включая пероральное, сублингвальное или ректальное. Парентеральное введение включает внутривенное, внутрикожное, внутримышечное, внутрибрюшинное, подкожное, окулярное, сублингвальное, интраназальное, ингаляционное, интраспинальное, внутрицеребральное и чрескожное введение (путем всасывания, например, через кожный проток). Соединение или агент также могут быть надлежащим образом введены с помощью перезаряжаемых или биоразлагаемых полимерных устройств или других устройств, например, пластырей и насосов, или препаратов, обеспечивающих пролонгированное, медленное или контролируемое высвобождение соединения или агента. Введение также может быть выполнено, например, один раз, множество раз и/или в течение одного или более длительных периодов. Согласно некоторым вариантам реализации введение включает как прямое введение, включая самостоятельное введение, так и не прямое введение, включая действия по назначению лекарственного средства. Например, в контексте настоящей заявки лечащий врач, который инструктирует пациента самостоятельно вводить лекарственное средство или получить лекарственное средство путем введения другим лицом, и/или который дает пациенту рецепт на лекарственное средство, вводит лекарственное средство указанному пациенту.

Антитела обычно вводят в диапазоне от приблизительно 0,1 до приблизительно 20 мг/кг массы тела пациента, обычно от приблизительно 0,5 до приблизительно 10 мг/кг и

часто от приблизительно 1 до приблизительно 5 мг/кг. В этой связи предпочтительно использовать антитела с периодом полувыведения из крови, равным по меньшей мере 12 часов, предпочтительно по меньшей мере 4 дня, более предпочтительно до 21 дня. Ожидается, что химерные антитела будут иметь период полувыведения из крови до 14-21

5 дня. В некоторых случаях может быть предпочтительным введение большой нагрузочной дозы с последующими периодическими (например, еженедельными) поддерживающими дозами в течение периода лечения. Антитела также могут быть доставлены с помощью систем доставки с медленным высвобождением, насосов и других известных систем доставки для непрерывной инфузии.

10 Термин «приблизительно» означает, что подразумевается допустимый интервал погрешности, например, до 5% или 10% для конкретного значения.

Настоящее изобретение дополнительно включает, в соответствии с другим аспектом, способ определения или количественной оценки CD112R в образце, причем указанный способ включает приведение биологического образца в контакт с антителом или

15 фрагментом антитела в соответствии с настоящим изобретением и измерение уровня образования комплекса.

Согласно настоящему изобретению также раскрыты способы диагностики и прогнозирования рака.

В соответствии с аспектом настоящего изобретения предложен способ диагностики

20 и/или прогнозирования рака или инфекционного заболевания у субъекта, причем указанный способ включает этап определения уровня экспрессии CD112R в биологическом образце от указанного субъекта с применением по меньшей мере одного антитела, описанного в настоящей заявке.

Термин «биологический образец» включает множество типов образцов, полученных

25 от организма, которые можно применять в диагностическом или мониторинговом анализе. Термин включает кровь и другие жидкие образцы биологического происхождения, образцы солидных тканей, такие как биоптат, или полученные из них тканевые культуры или клетки и их потомство. Кроме того, данный термин может включать циркулирующие опухолевые или другие клетки. Термин конкретно включает клинический образец и,

30 кроме того, включает клетки в клеточной культуре, клеточные супернатанты, клеточные лизаты, сыворотку, плазму, мочу, околоплодные воды, биологические жидкости, включая внутриглазную жидкость и стекловидное тело в качестве образцов из глаз, а также образцы тканей. Данный термин также включает образцы, с которыми после получения были произведены какие-либо манипуляции, такие как обработка реагентами,

35 солюбилизация или обогащение определенными компонентами.

Определение уровня экспрессии CD112R может быть выполнено с помощью меченого антитела к CD112R, как описано в настоящей заявке. Определение экспрессии может быть выполнено, например, с помощью ИФА.

Способ согласно настоящему изобретению может дополнительно включать этап
5 сравнения указанного уровня экспрессии с контрольным уровнем.

Следующие примеры представлены для более полной иллюстрации некоторых вариантов реализации настоящего изобретения. Тем не менее, их не следует рассматривать как каким-либо образом ограничивающие объем изобретения.

10 ПРИМЕРЫ

Ниже приведены ссылки на следующие примеры, которые вместе с приведенными выше описаниями иллюстрируют настоящее изобретение, но не ограничивают его.

Как правило, используемая в данной заявке номенклатура и лабораторные процедуры, применяемые в настоящем изобретении, включают молекулярные,
15 биохимические, микробиологические, иммунологические методики и методики рекомбинантной ДНК. Такие методики хорошо известны в данной области техники. Для удобства читателя в данной заявке приведены другие общие ссылки на общеизвестные процедуры.

20 **Пример 1. Экспрессия CD112R повышается после активации иммунных клеток.**

Экспрессия мРНК CD112R в иммунных клетках человека, как найдено в Базе данных экспрессии генов для иммунных клеток (DICE, <https://dice-database.org/>), отображена на Фиг. 1А. Показано, что CD112R экспрессируется главным образом на NK-клетках, В-клетках и Т-клетках. Для детектирования CD112R на иммунных клетках
25 человека (Фиг. 1В-1D) 50 тыс. клеток окрашивали, используя 30 мкл/лунку супернатантов из гибридомы клона 13 и 15. Для детектирования использовали козье антитело-647 к белку мыши (Jackson immunoresearch № по каталогу 315-605-006) в разведении 1:250. Использовали мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) от двух здоровых доноров. Хотя на поверхности покоящихся МКПК не было обнаружено детектируемого
30 окрашивания (Фиг. 1В), через 96 часов в среде NK (400 ед./мл hIL-2) с активацией 2 мкг/мл РНА-L наблюдали значительную и однородную экспрессию CD112R (Фиг. 1С). Обе протестированные популяции NK-клеток экспрессировали CD112R, независимо от статуса активации (Фиг. 1D).

Пример 2. CD112R представляет собой ингибирующий рецептор, преимущественно вовлеченный в связывание нектин-2

Схематическая иллюстрация рецепторов, экспрессируемых на иммунных клетках, и их соответствующие величины аффинности в отношении нектин-2 (CD112), ингибирующего лиганда для иммунных клеток, который экспрессируется опухолями или на антигенпрезентирующих клетках (АПК), показана на Фиг. 2. TIGIT представляет собой коингибирующий рецептор на иммунных клетках, таких как Т- и NK-клетки; DNAM-1 (также называемый CD226) представляет собой активирующий рецептор на иммунных клетках (например, Т-клетках), и CD112R (также называемый PVRIG) представляет собой коингибирующий рецептор на цитотоксических иммунных клетках (например, CD8+ Т- и NK-клетках); В соответствии с некоторыми вариантами реализации настоящего изобретения МАТ к CD112R блокируют взаимодействия CD112R с его лигандом нектином-2 и повышают активацию иммунных клеток, не препятствуя передаче сигналов DNAM-1.

Пример 3. Анализ характеристик связывания и блокирования МАТ к CD112R

Фиг. 3А иллюстрирует специфичное связывание клонов антитела к CD112R с клетками 293Т (высокотрансфицируемое производное клеток эмбриональной почки человека 293), сконструированными для сверхэкспрессии CD112R. МАТ к CD112R использовали в насыщающей дозе (66 нМ) на исходных клетках или на CD112R-сверхэкспрессирующих клетках 293Т. Только сверхэкспрессирующие клетки показали положительный сигнал окрашивания (без существенного различия между тестируемыми клонами), что указывает на высокую специфичность МАТ в отношении CD112R. Значения ЭК₅₀ обобщены на Фиг. 3В. Химерные МАТ к CD112R, содержащие IgG1 человека с заменой N31S или без нее, использовали в концентрации 0,4-99 нМ в ряде трехкратных разведений и инкубировали с клетками 293Т, которые сверхэкспрессируют CD112R. Для детектирования использовали козье антитело к белку человека, меченное аллофикоцианином (APC) (Jackson immunoresearch 109-136-170), в разведении 1:200. Связывание анализировали с помощью FACS и использовали для расчета значений ЭК₅₀. Эти результаты свидетельствуют о том, что все протестированные МАТ связывают CD112R, экспрессируемый на клеточной поверхности, с аффинностью в субнанолярном диапазоне или в нанолярном диапазоне. Вариант N31S, сконструированный для удаления мотива N-связанного гликозилирования в CDR1 тяжелой цепи, имел улучшенное (суб-нМ) связывание с CD112R человека в этом клеточном анализе. Кроме того, клетки 8866 (клетки хронического миелолейкоза), сверхэкспрессирующие нектин-2 человека, инкубировали с 10 мкг/мл (156 нМ) CD112R-

Fc в присутствии изотипического контроля или с указанными МАТ при 4 мкг/мл (26,4 нМ, что означает 6-кратный избыток CD112R-Fc). Как можно видеть на Фиг. 3С, блокирование связывания CD112R-Fc всеми протестированными вариантами превысило 95%.

Пример 4. Блокирование CD112R с помощью МАТ hIgG1 к CD112R усиливает активацию НК-клеток

НК-клетки от здоровых доноров инкубировали в присутствии различных МАТ и линий клеток-мишеней при соотношении Э:М 2:1 в течение 2 часов при 37°C. Активацию НК-клеток измеряли по индукции поверхностной экспрессии CD107a и отображали на Фиг. 4 как кратность изменения по сравнению с контрольным IgG (ось Y). Чтобы оценить, влияет ли тип Fc на функцию МАТ к CD112R, активность МАТ к CD112R (клон 13), содержащего мышиный IgG1 (инертная Fc без детектируемого связывания с hCD16), сравнивали с двумя другими МАТ к CD112R: химерным клоном-13-hIgG1 и химерным клоном-13 (N31S)-hIgG1 (VH0K0), оба из которых имеют Fc hIgG1 (эффекторная Fc, способная активировать hCD16). Все варианты антител тестировали при 2 нМ (0,3 мкг/мл). Как можно наблюдать на Фиг. 4А, оба МАТ hIgG-Fc демонстрировали значительное превосходство над антителом с инертной Fc. Таким образом, дальнейшую разработку проводили с использованием МАТ к CD112R с IgG1 человека. Для оценки аддитивных и синергетических эффектов блокаду CD112R комбинировали с дополнительными ICI, и результаты показаны на Фиг. 4В и 4С. Блокада CD112R двумя протестированными клонами МАТ индуцировала активацию НК (экспрессию CD107a на поверхности клеток), а также действовала синергически с блокадой других иммунных контрольных точек, включая блокирование TIGIT и PVR (NTX-1088). Все данные были статистически значимыми ($p < 0,05$) по сравнению с контрольным IgG. Эти данные свидетельствуют о том, что блокирование CD112R специфичными МАТ может повышать активность НК-клеток против раковых мишеней и может оказывать синергетическое действие на активацию НК при комбинировании с другими МАТ к ингибиторам иммунной контрольной точки (ICI). Все МАТ использовали при 3 мкг/мл (3+3 мкг/мл для комбинаций). Результаты показаны для линий раковых клеток человека A549 (Фиг. 4А, 4В аденокарцинома легкого) и MDA-MB-231 (Фиг. 4С, аденокарцинома молочной железы).

Пример 5. Блокирование CD112R с помощью МАТ к CD112R усиливает опосредуемое Т-клетками уничтожение опухолевых клеток

МКПК от здоровых доноров использовали для анализа уничтожения Т-клетками с использованием линий раковых клеток человека A549 (аденокарцинома легкого, Фиг. 5А) и RKO (колоректальный рак, Фиг. 5В). Все МАТ использовали при 3 мкг/мл (3+3 мкг/мл

использовали для комбинаций и 3+3+3 мкг/мл для тройной комбинации). В анализе использовали клон 13 антитела к CD112R. Уничтожение клеток-мишеней нормировали к данным для эффекторных клеток по отдельности (ось Y). Уничтожение клеток-мишеней оценивали с помощью набора для анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo® 2.0 от Promega (№ по каталогу G9242) в соответствии с протоколом производителя. Результаты показывают, что МАТ к CD112R приводят к значительному уничтожению клеток-мишеней, синергии с МАТ к TIGIT и МАТ к PD-1. Кроме того, блокирование всех трех рецепторов значительно увеличивало уничтожение клеток-мишеней по сравнению с влиянием отдельных МАТ и двойной комбинации МАТ.

Пример 6. Гуманизация антител к CD112R улучшила свойства связывания и возможности разработки МАТ

Последовательность варибельной области тяжелой цепи клона 13 антитела к CD112R содержала несколько ограничений, которые были устранены в процессе гуманизации.

Мотив дезамидирования в CDR1 легкой цепи устраняли путем обмена Asn (N) на Ser (S) (назван N31S).

Химерные варианты клон-13-hIgG1 и N31S (сайт дезамидирования устранен) (hIgG1) демонстрировали исключительно высокую аффинность и были значительно более сильными (в 3-30 раз) в связывании CD112R (PVRIG), чем референсное (контрольное) антитело, которое связывается с тем же антигеном (антитело, раскрытое в WO2016134333) (Таблица 1).

Таблица 1: аффинность химерного клона (клон 13) и клона N31S (в котором был удален мотив дезамидирования в аминокислоте № 31) и референсного антитела, основанного на последовательности из WO2016134333, для связывания CD112R человека (PVRIG).

Лиганд	Аналит	Ka (1/Mc)	Kd (1/c)	KD(M)
CD112R человека (PVRIG)	Клон 13	$3,4 \times 10^5$	$2,96 \times 10^{-6}$	8,71-12*
	Клон 13 (N31S)	$3,4 \times 10^5$	$3,26 \times 10^{-7}$	9,6-13*
	Контроль	$8,95 \times 10^4$	$2,19 \times 10^{-6}$	2,44-11*

* Предел инструмента Biacore

Затем получали варианты для удаления мотива N-связанного гликозилирования, обнаруженного в CDR1 тяжелой цепи (определение CDR по Chothia). Варианты

содержали замену аминокислотного остатка аспарагина (N) в положении 28 остатком, выбранным из аспарагиновой кислоты (D), аланина (A), глутамина (Q), серина (S) и треонина (T), и замену аминокислотного остатка треонина (T) в положении 30 аланином (A). Все варианты тестировали на продуктивность (на основе концентраций титра) и аффинность, как обобщено в Таблице 2.

Таблица 2: Продуктивность и аффинность вариантов, в которых был удален мотив N-связанного гликозилирования

Антитело	Вариант	Титр (мкг/мл)	Kd (M)	Относительная Kd
VH0Vk0	ДТ	47,6	$1,67 \times 10^{-10}$	1,00
VH0 N28D Vk0	N28D	4,7	$1,22 \times 10^{-10}$	0,73
VH0 N28A Vk0	N28A	3,9	$1,5 \times 10^{-10}$	0,9
VH0 N28Q Vk0	VH0 N28Q Vk0	3,0	$1,16 \times 10^{-10}$	0,69
VH0 N28S Vk0	N28S	4,0	$1,16 \times 10^{-10}$	0,66
VH0 N28T Vk0	VH0 N28T Vk0	3,2	$1,02 \times 10^{-10}$	0,61
VH0 T30A Vk0	T30A	6,0	$1,06 \times 10^{-10}$	0,63

На основании результатов по относительной аффинности отобрали вариант N28T. Удаление N-связанного гликозилирования не влияло на аффинность, но значительно снижало продуктивность. Для решения этой проблемы 11 вариантов гуманизированных тяжелых цепей с удаленным мотивом N-связанного гликозилирования конструировали как молекулы scFv на основе Fc IgG1 человека и тестировали на продуктивность (Таблица 3). Три наиболее продуктивных гуманизированных варианта scFv (№9-11) тестировали на связывание с CD112R человека (Таблица 4). Большинство гуманизированных вариантов scFv имели значительно улучшенное связывание по сравнению с scFv VH0K0 (клон 13 N31S).

Таблица 3: показывает продуктивность в клетках 293EBNA десяти гуманизированных вариантов, которые были сконструированы на основе мутации N28T и которые коэкспрессируются с немодифицированной легкой цепью в виде scFv. Молекулы scFv соединяли с Fc в качестве технического решения для быстрого продуцирования и скрининга вариантов.

ScFv-Fc	НЕК Титр (мкг/мл)
Вариант 0	0,559
Вариант 1	<0,4
Вариант 2	0,5353
Вариант 3	<0,4
Вариант 4	Не получен
Вариант 5	<0,4
Вариант 6	0,524
Вариант 7	<0,4
Вариант 8	<0,4
Вариант 9	6,61
Вариант 10	1,26
Вариант 11	8,23

Таблица 4: Аффинности связывания с CD112R человека вариантов тяжелой цепи (№9-11) и негуманизированного варианта (VH0), коэкспрессированного с немодифицированной легкой цепью (VK0) и с тремя гуманизированными вариантами легкой цепи, как указано

Антитело	Ka (1/Мс)	Kd (1/с)	Kd(M)	Относительная Kd
VH0K0	$2,90 \times 10^5$	$8,89 \times 10^{-5}$	$3,07 \times 10^{-10}$	1,00
VH10K2	$6,23 \times 10^5$	$1,33 \times 10^{-4}$	$2,14 \times 10^{-10}$	0,7
VH10K3	$5,45 \times 10^5$	$1,07 \times 10^{-4}$	$1,97 \times 10^{-10}$	0,64
VH11K1	$6,3 \times 10^5$	$1,01 \times 10^{-4}$	$1,65 \times 10^{-10}$	0,54
VH11K2	$5,52 \times 10^5$	$1,05 \times 10^{-4}$	$1,91 \times 10^{-10}$	0,62
VH11K3	$5,30 \times 10^5$	$1,01 \times 10^{-4}$	$1,90 \times 10^{-10}$	0,62

На основании близости к антителам зародышевой линии человека и отсутствия потенциальных мотивов связывания ГКГС-2 (прогнозируемых с помощью iTore™) для дальнейшего анализа отобрали пять вариантов. Аффинность отобранных вариантов показана в Таблице 5. Все варианты имели улучшенное связывание с CD112R человека по сравнению с химерным антителом (клон N31S).

Таблица 5: свойства отобранных полных вариантов антител после очистки

Антитело	Ka (1/Мс)	Kd (1/с)	Kd(M)	Относительная Kd
VH0K0	$2,10 \times 10^5$	$3,05 \times 10^{-5}$	$1,45 \times 10^{-10}$	1,16
VH0K0 N28T	$4,00 \times 10^5$	$5,02 \times 10^{-5}$	$1,26 \times 10^{-10}$	1

VH0K1 N28T*	$3,20 \times 10^5$	$8,30 \times 10^{-6}$	$2,59 \times 10^{-11}$	0,21
VH0K2 N28T	$3,98 \times 10^5$	$4,34 \times 10^{-5}$	$1,09 \times 10^{-10}$	0,87
VH0K3 N28T*	$3,30 \times 10^5$	$1,06 \times 10^{-5}$	$3,21 \times 10^{-11}$	0,25
VH9K0*	$3,00 \times 10^5$	$3,09 \times 10^{-6}$	$1,03 \times 10^{-11}$	0,08
VH9K1	$3,50 \times 10^5$	$3,87 \times 10^{-5}$	$1,11 \times 10^{-10}$	0,87
VH9K2*	$3,01 \times 10^5$	$1,30 \times 10^{-5}$	$4,32 \times 10^{-11}$	0,34
VH9K3	$3,30 \times 10^5$	$1,06 \times 10^{-5}$	$3,21 \times 10^{-11}$	1,22
VH10K0	$3,45 \times 10^5$	$4,66 \times 10^{-5}$	$1,35 \times 10^{-10}$	1,07
VH10K1	$3,51 \times 10^5$	$4,18 \times 10^{-5}$	$1,19 \times 10^{-10}$	0,94
VH10K2	$3,59 \times 10^5$	$4,27 \times 10^{-5}$	$1,19 \times 10^{-10}$	0,94
VH10K3	$3,61 \times 10^5$	$4,36 \times 10^{-5}$	$1,21 \times 10^{-10}$	0,96
VH11K0	$3,16 \times 10^5$	$3,19 \times 10^{-5}$	$1,01 \times 10^{-10}$	0,8
VH11K1*	$2,87 \times 10^5$	$4,79 \times 10^{-6}$	$1,67 \times 10^{-11}$	0,13
VH11K2	$3,36 \times 10^5$	$3,77 \times 10^{-5}$	$1,12 \times 10^{-10}$	0,89
VH11K3*	$3,07 \times 10^5$	$2,42 \times 10^{-5}$	$7,88 \times 10^{-11}$	0,63

* Предел чувствительности прибора Biacore

Пример 7. Сходное связывание МАТ к CD112R с CD112R человека и яванской макаки

5 Гуманизированные МАТ тестировали на предмет связывания эндогенного и сверхэкспрессированного CD112R человека и яванской макаки. Результаты показывают, что аффинность гуманизированных МАТ к CD112R человека и обезьяны является сходной. В Таблице 6 обобщены значения $ЭК_{50}$, рассчитанные на основе кривых связывания отобранных гуманизированных (Hu) МАТ, которые использовали в

10 концентрации 99-0,05 нМ в ряде трехкратных разведений, с клетками 293Т, экспрессирующими CD112R человека (идентификатор белка NP_076975.2) или яванской макаки (Cyno) (*Macaca fascicularis*) (идентификатор белка: XP_005549281.1). Для детектирования использовали ослиное антитело-647 к белку человека (Jackson immunoresearch № по каталогу 109-605-006) в разведении 1:250.

15 В Таблице 7 обобщены значения $ЭК_{50}$, рассчитанные на основе кривых связывания отобранных гуманизированных МАТ с CD8 Т-клетками яванской макаки и NK-клетками человека, при этом оба типа клеток экспрессируют эндогенный CD112R соответствующего вида. Анализ выполняли, как показано в Таблице 6. Для сравнения использовали МАТ к CD112R, раскрытое в WO2016134333. Относительные значения $ЭК_{50}$

20 также обобщены в Таблицах 6 и 7. Максимальное связывание также оценивали (макс. связывание белка человека – фон / макс. связывание белка яванской макаки – фон) и обобщили в Таблице 8. Все гуманизированные варианты имеют полную перекрестную

реактивность между мишенями человека и яванской макаки. Кроме того, наблюдается лучшее связывание всех гуманизированных вариантов с антигеном по сравнению с контрольным антителом, причем три из пяти гуманизированных вариантов имеют более чем двукратное улучшение связывания по сравнению с референсным антителом, а остальные два варианта проявляют улучшение приблизительно на 50%.

Таблица 6: оценка характеристик связывания ($ЭK_{50}$ и максимальное связывание) отобранных гуманизированных МАТ к CD112R с CD112R клеточной поверхности

Наименование клона	H0K0	H10K2	H10K3	H11K1	H11K2	H11K3
$ЭK_{50}$ нМ HuCD112R	0,55	0,40	0,30	0,30	0,28	0,31
$ЭK_{50}$ нМ СуноCD112R	0,97	0,42	0,50	0,72	0,71	0,60
Соотношение Суно/Hu	1,75	1,07	1,67	2,43	2,54	1,93

Таблица 7: оценка связывания отобранных гуманизированных МАТ к CD112R с CD8 Т-клетками яванской макаки и с НК-клетками человека, которые экспрессируют эндогенный CD112R соответствующего вида.

Наименование клона	H10K2	H10K3	H11K1	H11K2	H11K3	Комбинация
$ЭK_{50}$ нМ Hu	0,86	0,77	0,91	1,06	1,11	1,87
$ЭK_{50}$ нМ Суно	1,45	1,39	1,46	1,29	1,27	2,05
Соотношение Суно/Hu	1,69	1,81	1,61	1,22	1,14	1,09

Таблица 8: обобщенные данные по оценке абсолютного и относительного максимального связывания отобранных гуманизированных МАТ к CD112R с CD8 Т-клетками яванской макаки и с НК-клетками человека, которые экспрессируют эндогенный CD112R соответствующего вида. Относительное связывание (соотношение) рассчитывали как (максимальное связывание с белком человека – фон)/ (максимальное связывание с белком яванской макаки – фон)

Наименование клона	H10K2	H10K3	H11K1	H11K2	H11K3	Комбинация
Макс. связывание Hu (MFI отн.ед. - фон)	975	988	982	1018	1005	993
Макс. связывание Суно (MFI отн.ед. - фон)	914	933	820	839	833	1583
Соотношение Hu/Суно	1,07	1,06	1,20	1,21	1,21	0,63

Пример 8. Гуманизированные МАТ к CD112R эффективно блокируют связывание CD112R с CD112

Гуманизированные антитела к CD112R являются сильными блокаторами взаимодействий CD112R – нектин-2. Клетки 293T, сверхэкспрессирующие CD112R, инкубировали (75 тыс./лунку) со слитым белком hнектин-2-mIgG2a в установленной дозе (125 нМ) в присутствии или в отсутствие гуманизированных МАТ к CD112R на льду в течение 30 минут. Антитела добавляли в диапазоне концентраций 40-0,018 нМ в ряде трехкратных разведений. Количество связанного hнектин-2-mIgG2a детектировали с помощью антител к белку мыши, флуоресцентно меченных Dy-light 647 (115-606-071 Jackson immunoresearch), и анализировали с помощью FACS. Значения ЭК₅₀ и ЭК₉₀ рассчитывали по полученным кривым титрования и обобщили ниже в Таблице 9. Результаты показывают, что гуманизированные антитела к CD112R способны блокировать взаимодействия CD112R-CD112 в субнанолярных концентрациях.

Таблица 9: блокирование взаимодействий CD112R с нектином-2 гуманизированными антителами к CD112R

Клон антитела	H11K1	H11K2	H11K3
ЭК ₅₀ нМ	0,29	0,32	0,26
ЭК ₉₀ нМ	10,7	9,9	9,6

Пример 9. Блокирование CD112R с помощью гуманизированных МАТ к CD112R усиливает активацию НК-клеток по сравнению с исходными МАТ и

действует синергически с блокированием TIGIT

Для изучения блокирующего эффекта гуманизированных МАТ к CD112R NK-клетки от здорового донора инкубировали в присутствии различных МАТ с клетками A549 (аденокарцинома легкого) при соотношении Э:М 2:1 в течение 2 часов при 37°C.

5 Активацию NK-клеток измеряли по индукции поверхностной экспрессии CD107a и отображали на Фиг. 6 как кратность изменения по сравнению с контрольным IgG (ось Y). Все МАТ использовали при 3 мкг/мл (3+3 для комбинаций). Все МАТ к CD112R (серые столбики) значительно увеличивали активацию NK-клеток ($p < 0,0005$). Кроме того, гуманизированные антитела к CD112R превосходили исходные негуманизированные (H0K0) химерные варианты ($p < 0,05$). Кроме того, все гуманизированные варианты действовали синергически с МАТ к TIGIT (черные столбики), что приводило к значительному увеличению активности по сравнению с каждым средством лечения по отдельности ($p < 0,015$).

15 В целом, данные позволяют предположить, что гуманизированные МАТ к CD112R являются сильными индукторами активации NK-клеток, превосходящими исходные антитела к CD112R и сохраняющими синергетический эффект при комбинировании с МАТ к TIGIT.

Пример 10. Блокирование CD112R с помощью гуманизированных МАТ к CD112R усиливает активацию NK-клеток дозозависимым образом и действует синергически с блокированием PVR

NK-клетки от здорового донора инкубировали в присутствии различных МАТ с клетками MDA-MB-231 (аденокарцинома молочной железы) при соотношении Э:М 2:1 в течение 1,5 часов при 37°C. Активацию NK-клеток измеряли по индукции поверхностной экспрессии CD107a, проанализированной с помощью FACS, и отображали как кратность изменения по сравнению с контрольным IgG (ось Y). Гуманизированные МАТ (H11K1, H11K2 и H11K3, имеющие последовательность вариабельной области HC, представленную в SEQ ID NO: 39, и последовательность вариабельной области LC, представленную в SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, соответственно) использовали в диапазоне концентраций от 53 до 0,05 нМ в 4-кратных разведениях (Фиг. 25 7A). Кроме того (Фиг. 7B), установленную дозу 13 нМ каждого МАТ тестировали в комбинации с 13 нМ антитела к PVR (NTX-1088). На Фиг. 7A показано, что кандидатные гуманизированные МАТ к CD112R являются сильными индукторами активации NK. Все протестированные МАТ к CD112R значительно ($p < 0,0172$) увеличивали активацию NK-клеток до концентрации 0,05 нМ, что приблизительно в 10 раз ниже ЭК₅₀. Все 30 кандидатные гуманизированные варианты (серые столбики) действовали синергически с

антителом к PVR NTX-1088 (черные столбики), что приводило к значительному ($p<0,03$) увеличению активности по сравнению с каждым средством лечения по отдельности. В целом, данные позволяют предположить, что гуманизированные МАТ к CD112R являются сильными активаторами NK-клеток и что отобранные варианты действуют синергически с МАТ к PVR в активации NK-клеток.

Пример 11. Гуманизированные МАТ к CD112R превосходят негуманизированные МАТ и референсное МАТ к CD112R в активации Т-клеток

Чтобы протестировать влияние гуманизированных антител к hCD112R на активацию Т-клеток, клетки Jurkat, сверхэкспрессирующие CD112R человека (Jurkat hCD112R), инкубировали с клетками A549 (высокая экспрессия нектин-2) в присутствии антитела к CD3 с указанными МАТ к CD112R или без них. Через 24 часа планшеты центрифугировали, и собирали супернатанты. Количественную оценку IL-2 проводили с использованием ИФА для IL-2 человека (MAXTM Deluxe от Biolegend) в соответствии с протоколом производителя. На Фиг. 8А показан анализ зависимости ответа от дозы всех гуманизированных вариантов и референсного антитела к CD112R (раскрытого в WO2016134333) в диапазоне концентраций 4-0,0625 мкг/мл. Большинство гуманизированных клонов превосходили исходный негуманизированный клон (НОК0), и все варианты антитела к CD112R превосходили референсное антитело при всех протестированных концентрациях в отношении индукции секреции IL-2. На Фиг. 8В проиллюстрированы отобранные гуманизированные варианты, протестированные как на Фиг. 7А, в диапазоне концентраций 26,4-0,1 нМ. Референсное антитело добавляли только в наивысшей концентрации 24,6 нМ. Все отобранные варианты приводили к значительной индукции ($p<0,0003$) секреции IL-2. Сравнение проводили с самой высокой концентрацией hIgG1. Более того, антитела H11K2 и H11K3 были значительно ($p<0,004$) более сильными, чем референсное антитело даже при самой низкой протестированной концентрации, H11K1 значительно превосходило референсное антитело, начиная с 0,41 нМ ($p<0,02$).

Эти результаты указывают на то, что МАТ к CD112R являются сильными индукторами активации Т-клеток со значительным преимуществом по сравнению с существующим референсным антителом.

Пример 12. Блокирование CD112R с помощью МАТ к CD112R усиливает активацию Т-клеток

МКПК от здоровых доноров использовали для анализа активации Т-клеток с использованием линии раковых клеток человека A549 (аденокарцинома легкого). МКПК инкубировали в течение 48 часов с клетками-мишенями при соотношении Э:М 2:1 в

присутствии 1 мкг/мл МАТ к CD3 (ОКТ3).

Эффекторные клетки собирали и окрашивали на предмет поверхностной экспрессии (Фиг. 9А) CD69 (BLG-310906) и (Фиг. 9В) CD137 (BLG-309804, оба от Biolegend). Поверхностную экспрессию (MFI) маркеров нормировали к группе без МАТ.

5 Как показано на Фиг. 9, блокирование CD112R с помощью гуманизированного МАТ к CD112R H11K2 усиливало активацию Т-клеток. Блокада CD112R оказывала аддитивный эффект с блокированием дополнительных ICI, таких как PVR (NTX-1088) и PD-1 (китруда). Все изменения статистически значимы ($p < 0,05$).

Пример 13. Влияние антитела к CD112R на активацию НК-клеток в
10 **присутствии клеток-мишеней, экспрессирующих нектин-2, не имеющих PVR, и**
влияние экспрессии PVR на активность

НК-клетки от здоровых доноров инкубировали в присутствии различных МАТ и линий клеток-мишеней при соотношении Э:М 1:1 в течение 20 часов при 37°C. Активацию НК-клеток измеряли по индукции поверхностной экспрессии CD137 и отображали на Фиг. 10 как кратность индукции по сравнению с отсутствием антитела (ось Y). Гуманизированное МАТ к CD112R (H11K3, содержащее Fc hIgG1) сравнивали с NTX-1088 (антитело к PVR) или с МАТ к TIGIT тираголумабом (запись KEGG DRUG D11482) по отдельности и в комбинациях. Блокада CD112R кандидатным гуманизированным вариантом была наиболее сильной из всех обработок, когда клетки-мишени не
15 экспрессировали мембранный PVR (Фиг. 10А). При экспрессии PVR CD112R действовал синергически с блокадой другой иммунной контрольной точки, включая блокирование TIGIT и блокирование PVR. Комбинация NTX-1088 и антитела к CD112R значительно превосходила все другие вмешательства. Все МАТ использовали при 3 мкг/мл (3+3 мкг/мл для комбинаций). Результаты показаны для линий раковых клеток хориокарциномы
20 человека JEG3, не имеющих эндогенного PVR (Фиг. 10А), и JEG3-hPVR (сверхэкспрессия PVR человека, Фиг. 10В). * $p < 0,005$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ согласно двустороннему t-критерию Стьюдента. Показаны типичные данные двух из пяти доноров.

Пример 14. Влияние антитела к CD112R на активацию НК-клеток в
присутствии раковых клеток-мишеней

30 НК-клетки от здоровых доноров инкубировали в присутствии различных МАТ и линий клеток-мишеней: H1299 (НМРЛ, Фиг. 11А), A549 (аденокарцинома легкого, Фиг. 11В) или MDA-MB-231 (тройной негативный рак молочной железы, Фиг. 11С) при соотношении Э:М 1:1 в течение 48 часов при 37°C. Активацию НК-клеток измеряли по индукции поверхностной экспрессии CD137 и отображали на Фиг. 11 как кратность
35 индукции по сравнению с отсутствием антитела (ось Y). Гуманизированное МАТ к

CD112R с Fc hIgG1 (H1K3) оценивали по отдельности или в комбинациях, как в Примере 1. Во всех условиях блокада CD112R по отдельности оказывала значительное влияние на активацию NK-клеток. Кроме того, CD112R действовал синергически с блоками других иммунных контрольных точек, включая блокирование TIGIT (путем введения тиргаолумаба, запись KEGG DRUG D11482) и блокирование PVR (NTX-1088). Следует отметить, что комбинация NTX-1088 и МАТ к CD112R значительно превосходила все другие вмешательства во всех протестированных клеточных линиях. Все МАТ использовали при 3 мкг/мл (3+3 мкг/мл для комбинаций). * $p < 0,005$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ согласно двустороннему t-критерию Стьюдента. Показаны типичные данные двух из четырех доноров NK.

Пример 15. МАТ к CD112R ингибируют рост опухоли *in vivo*

Эффективность МАТ продемонстрирована *in vivo* с использованием моделей на животных. В качестве модели использовали мышей с ослабленным иммунитетом (NSG, NOG или эквивалент). Линии клеток-мишеней, которые естественным образом экспрессируют нектин-2 (например, A549, MDA-MB-231, RKO), инъецируют подкожно (п/к) мышам в количествах, достаточных для обеспечения устойчивого роста опухоли (например, 5×10^6 клеток на мышь). Для получения иммунных клеток опухолевые клетки смешивают и инъецируют с соответствующими иммунными клетками человека (например, целыми МКПК, очищенными Т-клетками, очищенными CD8⁺ Т-клетками или NK-клетками).

Затем у мышей контролируют рост опухоли до образования пальпируемых опухолей. На этом этапе мышей рандомизируют для различных групп лечения, которые получают либо контрольный IgG, либо МАТ к CD112R, либо МАТ к PD-1, либо их комбинацию. Влияние индивидуального и комбинированного с ICI лечения на ингибирование роста опухоли оценивают с течением времени по сравнению с контрольной группой IgG.

Дополнительный подход основан на восстановлении иммунных клеток после образования опухолей. В этом случае применяют тех же мышей и опухолевые клетки, как и описанные выше. Однако вышеупомянутые иммунные клетки человека вводят путем внутривенной (в/в) инъекции и только после образования пальпируемых опухолей. Через день мышей рандомизируют в разные группы лечения, и ингибирование роста опухоли оценивают, как указано выше.

Третья стратегия заключается в том, что человеческие гемопоэтические стволовые клетки, а не зрелые лейкоциты, используются для восстановления недостающих иммунных клеток у иммунодефицитных мышей. После того, как гемопоэтические клетки

дают начало зрелым иммунным клеткам человека на периферии, полученных «гуманизированных» мышей используют для имплантации опухоли и тестирования эффектов различных МАТ к ICI, как описано выше для подхода в/в восстановления.

Пример 16. Влияние антитела к CD112R на рост опухоли у мышей

5 Эффективность лечения МАТ к CD112R *in vivo* оценивали у мышей. Клетки A549 совместно имплантировали при соотношении Э:М 1:5 с МКПК от здорового донора мужского пола (1×10^6 МКПК, смешанных с 5×10^6 клеток A549). Клеточную смесь имплантировали п/к в заднюю часть бока самцов мышей NSG-HLA-A2/HND при

10 объемном соотношении клеток в ФСБ:матригеле 1:1 (матрикс Matrigel[®], Corning реф. 356234) в конечном объеме 100 мкл/животное. На день 3 после имплантации начинали лечение либо контрольным МАТ IgG1 (InVivoMAb, изотипический контрольный IgG1 человека BE0297 от Biorcell), либо МАТ к CD112R, либо МАТ к PD-1 (пембролизумаб) один раз в неделю при 10 мг/кг с получением в общей сложности 5 доз. Объем опухоли измеряли один раз в неделю с помощью штангенциркуля. На день 35 средний объем

15 опухоли в контрольной группе, получавшей IgG, составлял 641 мм^3 , и объем опухоли в группе, получавшей антитело к PD-1, составлял 840 мм^3 (Фиг. 12). Эти результаты существенно не отличались согласно двухфакторному дисперсионному анализу. С другой стороны, средний объем опухолей, обработанных антителом к CD112R, составил 200 мм^3 , что составляет 68% ингибирования роста опухоли, и значительное уменьшение опухоли

20 по сравнению с животными, получавшими IgG (**p=0,001 согласно двухфакторному дисперсионному анализу).

Пример 17. Последовательности антител

Таблица 10: подробная информация о последовательностях CDR, последовательностях вариабельных областей различных клонов и их вариантов, а также

25 последовательностях scFv.

	Аминокислотные SEQ ID NO:	Нуклеотидные SEQ ID NO:
Клон 13 и варианты		
HC CDR1	1, 7	
HC CDR2	2, 8	
HC CDR3	3	
LC CDR1	4	
LC CDR2	5	
LC CDR3	6	

Вариабельная область HC	17	16, 24
Вариабельная область LC	19	18, 25
LC, где X= N (сайт дезамидирования) или S	26	
LC, где N31S (удаление дезамидирования)	27	
HC, где N-связанный сайт гликозилирования X ₁ = N (исходный), D, A, Q, S или T; X ₂ =T (исходный) или A	28	
HC вариант 1 (H1)	29	
HC вариант 2 (H2)	30	
HC вариант 3 (H3)	31	
HC вариант 4 (H4)	32	
HC вариант 5 (H5)	33	
HC вариант 6 (H6)	34	
HC вариант 7 (H7)	35	
HC вариант 8 (H8)	36	
HC вариант 9 (H9)	37	
HC вариант 10 (H10)	38	
HC вариант 11 (H11)	39	
LC вариант 1 (K1)	40	
LC вариант 2 (K2)	41	
LC вариант 3 (K3)	42	
Варианты scFv, связанные с hIgG1		
Вариант_0	43	
Вариант 1 N28T LC	44	
Варианты_2-11	45-54	
Клон 15		
HC CDR1	9, 7	
HC CDR2	10, 12	
HC CDR3	3	
LC CDR1	11	

LC CDR2	5	
LC CDR3	6	
Вариабельная область HC	21	20
Вариабельная область LV	23	22

Приведенное выше описание конкретных вариантов реализации будет настолько полно раскрывать общий характер изобретения, что другие могут, применяя общие знания, легко изменять и/или адаптировать такие конкретные варианты реализации для различных применений без проведения излишних экспериментов и без отклонения от общей концепции, и, следовательно, такие адаптации и модификации должны быть включены и предназначены для включения в пределах значения и диапазона эквивалентов раскрытых вариантов реализации. Следует понимать, что формулировки или терминология, используемые в данной заявке, предназначены для описания, а не ограничения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, которое связывается с CD112R или фрагмент указанного антитела, содержащий по меньшей мере антигенсвязывающую часть, причем указанное антитело или фрагмент антитела содержат:

(i) три определяющих комплементарность участка (CDR) вариабельной области тяжелой цепи (HC), содержащей SEQ ID NO: 16, и три CDR вариабельной области легкой цепи (LC), содержащей SEQ ID NO: 18, или их аналог или производное, имеющее по меньшей мере 90% идентичности последовательности с указанной последовательностью антитела или фрагмента; или

(ii) три CDR вариабельной области тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 21, и три CDR вариабельной области легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 23, или их аналог или производное, имеющее по меньшей мере 90% идентичности последовательности с указанной последовательностью антитела или фрагмента.

2. Антитело или фрагмент антитела по п. 1, содержащие набор из шести CDR, причем: последовательность CDR1 тяжелой цепи содержит последовательность GYX_1FX_2SY (SEQ ID NO: 1), где X_1 обозначает N, D, A, Q, S или T, и X_2 представляет собой T или A, или последовательность SYWIN (SEQ ID NO: 7), CDR2 тяжелой цепи содержит последовательность YPGSYIP (SEQ ID NO: 2), CDR3 тяжелой цепи, содержит последовательность GYFDV (SEQ ID NO: 3), CDR1 легкой цепи содержит последовательность KSSQSLLXSGNQKNYLA (SEQ ID NO: 4), где X обозначает N или S, CDR2 легкой цепи содержит последовательность GASTRES (SEQ ID NO: 5), и CDR3 легкой цепи содержит последовательность QNDHSYPYT (SEQ ID NO: 6).

3. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп. 1-2, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 21, или аналог, имеющий по меньшей мере 95% сходства последовательности с указанной последовательностью вариабельной области тяжелой цепи.

4. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп. 1-3, содержащие вариабельную последовательность легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 23, или аналог, имеющий по меньшей мере 95% сходства последовательности с указанной последовательностью вариабельной области легкой цепи.

5. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп. 1-4, содержащие

тяжелую цепь и легкую цепь, отличающиеся тем, что указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 28, и указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 26.

6. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп. 1-4, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, отличающиеся тем, что указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 21, и указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 23.

7. Вариант антитела или фрагмента антитела по любому из пп. 5 или 6, имеющий по меньшей мере 95% идентичности с указанной легкой цепью или тяжелой цепью антитела.

8. Фрагмент антитела по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что указанный фрагмент антитела представляет собой одноцепочечный Fv (scFv).

9. Полипептид, содержащий scFv по п. 8 и область Fc IgG1 человека, причем последовательность полипептида содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 43-54, или их аналог или производное, имеющие по меньшей мере 90% идентичности последовательности с указанным антителом.

10. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп. 1-9, отличающиеся тем, что указанное антитело связывается с CD112R человека с аффинностью от $0,5 \times 10^{-9}$ М до 10^{-11} М.

11. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп. 1-10, отличающиеся тем, что указанное антитело содержит Fc hIgG1.

12. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп. 1-11, отличающиеся тем, что указанное антитело представляет собой гуманизированное антитело.

13. Антитело или фрагмент антитела по п. 12, отличающиеся тем, что CDR1 тяжелой цепи представляет собой GYTFTSY (SEQ ID NO: 13); или SYWIN (SEQ ID NO: 7).

14. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп. 12 или 13, отличающиеся тем, что CDR1 легкой цепи представляет собой KSSQSLSSGNQKNYLA (SEQ ID NO: 15).

15. Антитело или фрагмент антитела по любому из предшествующих пунктов, содержащие набор из шести CDR, причем: последовательность CDR1 тяжелой цепи содержит последовательность GYTFTSY (SEQ ID NO: 13), CDR2 тяжелой цепи содержит последовательность YPGSYIP (SEQ ID NO: 2), CDR3 тяжелой цепи содержит последовательность GYFDV (SEQ ID NO: 3), CDR1 легкой цепи содержит последовательность KSSQSLSSGNQKNYLA (SEQ ID NO: 15), CDR2 легкой цепи содержит последовательность GASTRES (SEQ ID NO: 5), и CDR3 легкой цепи содержит последовательность QNDHSYPYT (SEQ ID NO: 6).

16. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп. 12-15, отличающиеся тем, что указанное гуманизированное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 и 39; или аналог, имеющий по меньшей мере 95% сходства последовательности с указанной последовательностью варибельной области тяжелой цепи.

17. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп. 12-16, отличающиеся тем, что указанное гуманизированное антитело содержит легкую цепь, содержащую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 40, 41 и 42; или аналог, имеющий по меньшей мере 95% сходства последовательности с указанной последовательностью варибельной области тяжелой цепи.

18. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп. 12-17, отличающиеся тем, что указанное гуманизированное антитело содержит тяжелые и легкие цепи, выбранные из группы, состоящей из:

(i) тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 39, и легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 40;

(ii) тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 39, и легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 41; и

(iii) тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 39, и легкой цепи, содержащей SEQ ID NO: 42.

19. Полинуклеотидная последовательность, кодирующая по меньшей мере одну последовательность области тяжелой цепи или легкой цепи антитела или фрагмента антитела по любому из пп. 1-18.

20. Полинуклеотидная последовательность по п. 18, кодирующая варибельную область тяжелой цепи антитела, отличающаяся тем, что указанная полинуклеотидная последовательность содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 24 или их варианта, имеющего по меньшей мере 85% идентичности с указанными последовательностями.

21. Полинуклеотидная последовательность по п. 19, кодирующая варибельную область легкой цепи антитела, отличающаяся тем, что указанная полинуклеотидная последовательность выбрана из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 25, или их варианта, имеющего по меньшей мере 85% идентичности с указанными последовательностями.

22. Плазида, содержащая по меньшей мере одну полинуклеотидную

последовательность по любому из пп. 19-21.

23. Клетка, содержащая полинуклеотидную последовательность по любому из пп. 19-21.

24. Клетка, способная продуцировать антитело по любому из пп. 1-18.

5 25. Фармацевтическая композиция, содержащая в качестве активного ингредиента по меньшей мере одно антитело или его фрагмент по любому из пп. 1-18 и фармацевтически приемлемые вспомогательное вещество, разбавитель, соль или носитель.

10 26. Фармацевтическая композиция по п. 25 для применения при модуляции иммунной системы путем ингибирования связывания CD112R с нектином-2.

27. Фармацевтическая композиция по п. 25 для применения при лечении рака у субъекта.

28. Фармацевтическая композиция по п. 25 для применения при предотвращении или лечении вирусной инфекции у субъекта.

15 29. Способ лечения рака, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по п. 25.

20 30. Способ по п. 29, дополнительно включающий дополнительную противораковую терапию, выбранную из хирургического вмешательства, химиотерапии, лучевой терапии и иммунотерапии.

31. Способ по п. 29, дополнительно включающий введение указанному субъекту дополнительного иммуномодулятора, активированной лимфоцитарной клетки, ингибитора киназы, химиотерапевтического агента или любого другого противоракового агента.

25 32. Способ по п. 31, отличающийся тем, что указанный дополнительный иммуномодулятор представляет собой антитело к молекуле иммунной контрольной точки.

30 33. Способ по п. 32, отличающийся тем, что указанный дополнительный иммуномодулятор представляет собой антитело, выбранное из группы, состоящей из антитела к PD-1, антитела к TIGIT, антитела к PVR и любой их комбинации.

34. Способ по любому из пп. 29-33, отличающийся тем, что указанный рак представляет собой солидный рак.

35. Способ по любому из пп. 29-33, отличающийся тем, что указанный рак представляет собой гемобластоз.

35 36. Способ по любому из пп. 29-33, отличающийся тем, что указанный рак

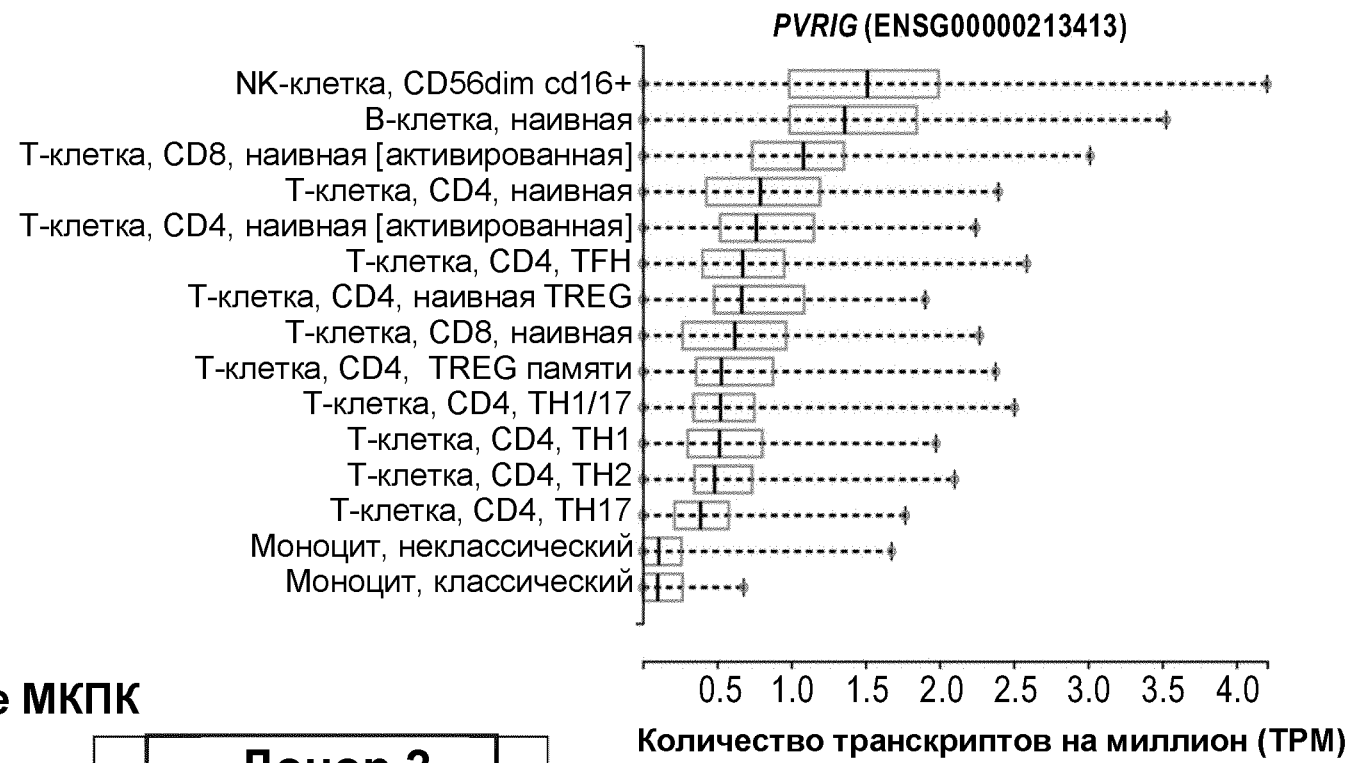
выбран из группы, состоящей из аденокарциномы легкого, аденокарциномы молочной железы и колоректального рака.

5 37. Способ по любому из пп. 29-33, отличающийся тем, что лечение приводит к предотвращению или уменьшению образования, роста или распространения метастазов у субъекта.

10 38. Способ определения или количественной оценки CD112R в образце, причем указанный способ включает приведение биологического образца в контакт с антителом или фрагментом антитела и измерение уровня образования комплекса, причем указанное антитело или фрагмент антитела представляют собой антитело или фрагмент антитела по любому из пп. 1-18.

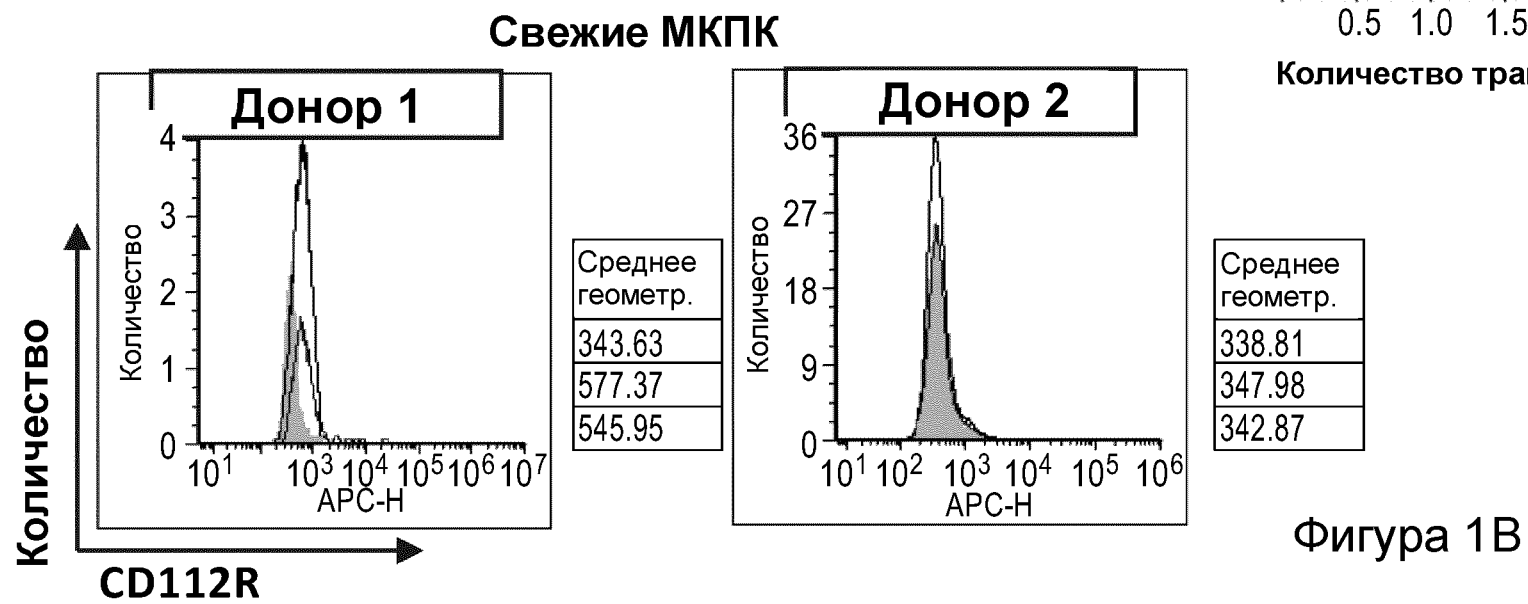
15 39. Способ диагностики или прогнозирования рака у субъекта, причем указанный способ включает определение уровня экспрессии CD112R в биологическом образце от указанного субъекта с применением по меньшей мере одного антитела или фрагмента антитела по любому из пп. 1-18.

40. Также предложен набор для измерения экспрессии или присутствия CD112R в биологическом образце, содержащий по меньшей мере одно антитело или фрагмент антитела по любому из пп. 1-18.

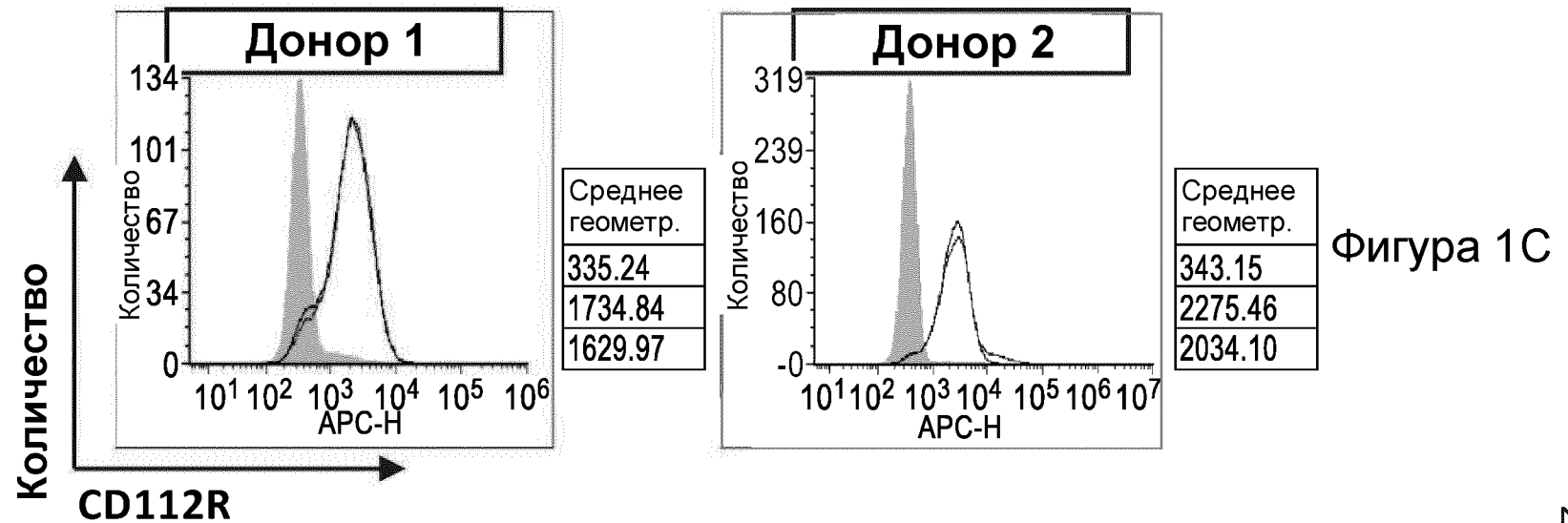


1/13

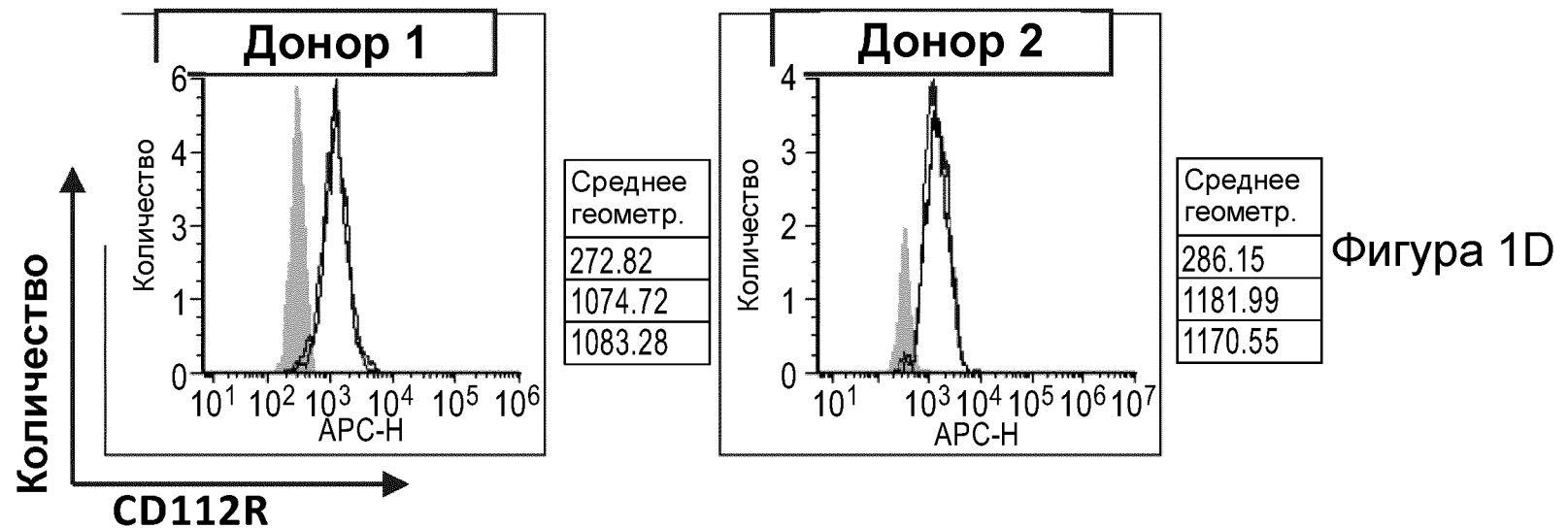
Фигура 1А

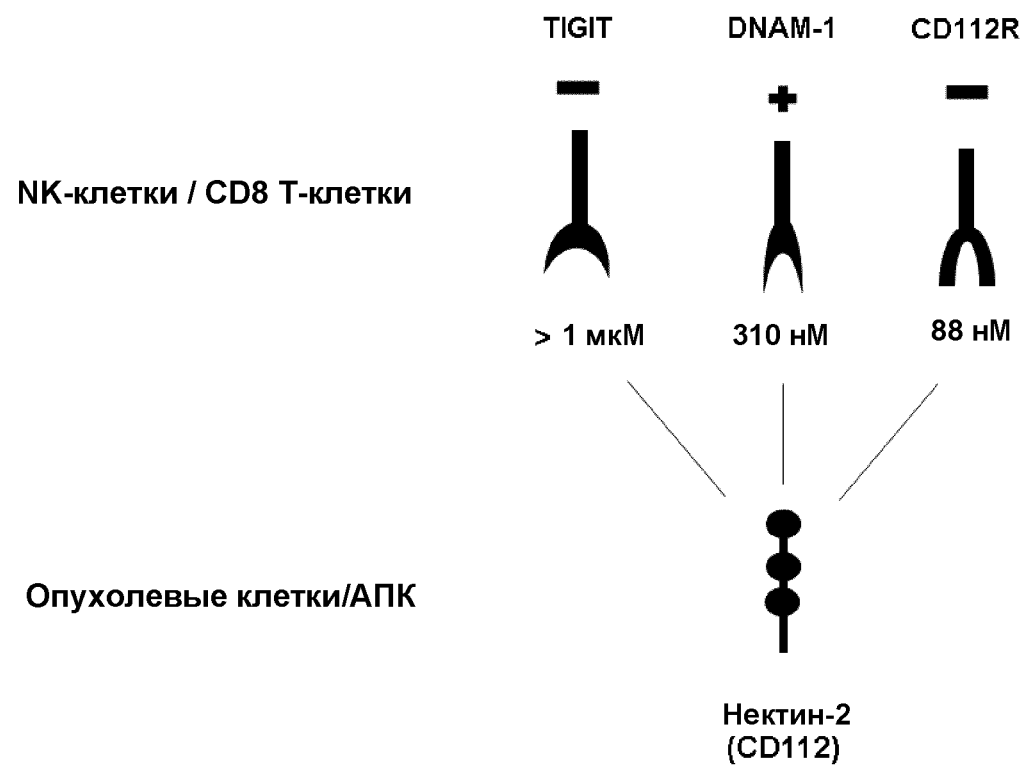


Активированные МКПК



НК-клетки

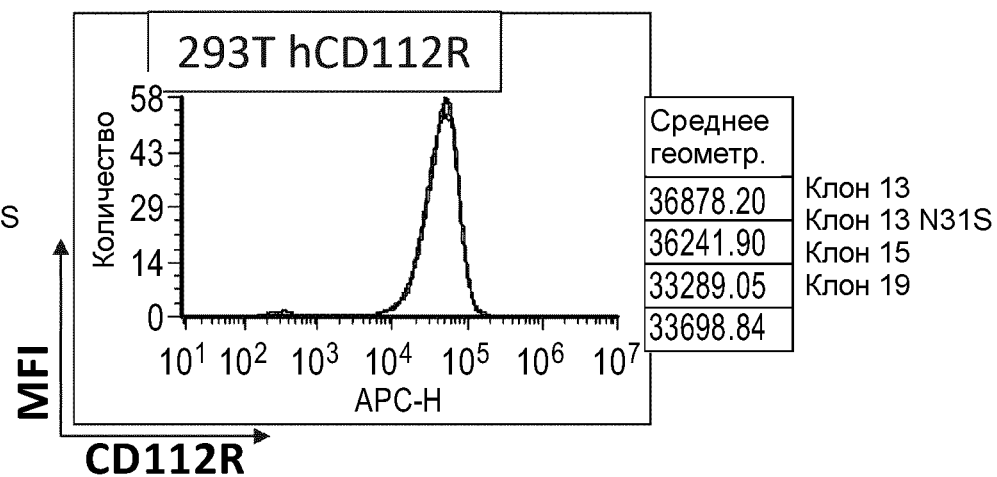




Фигура 2

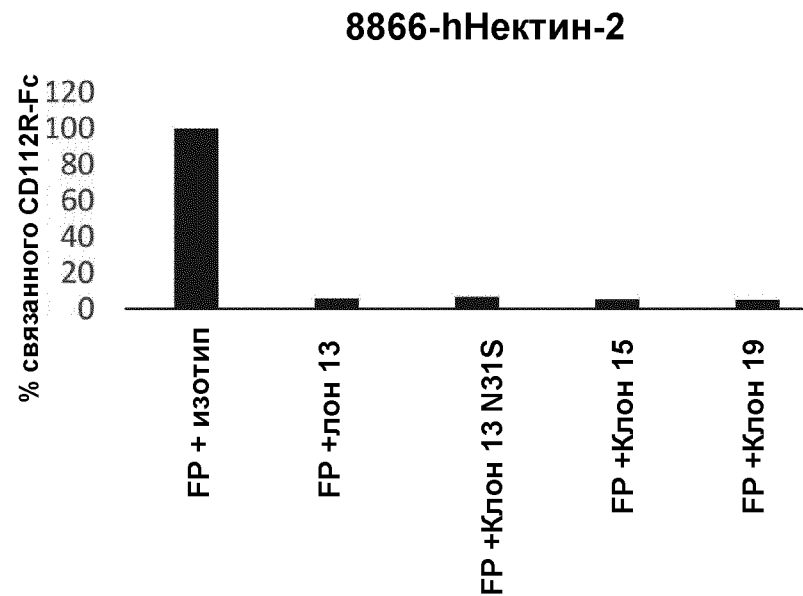


Фигура 3А

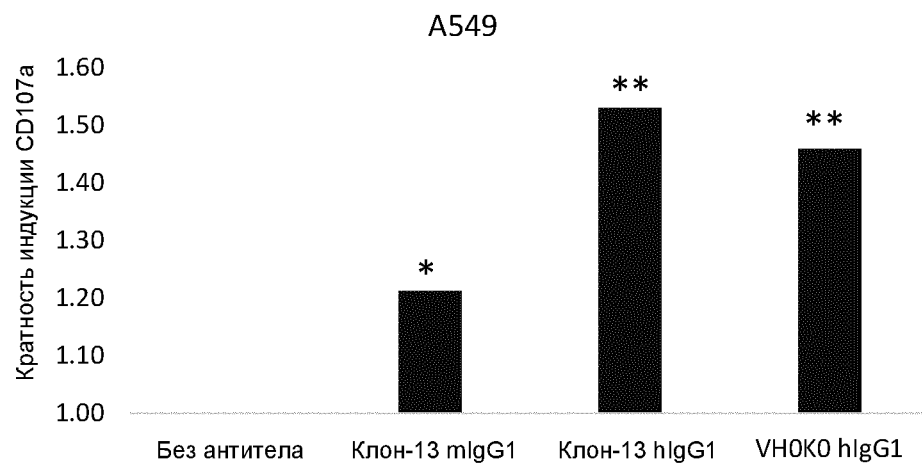


	Клон 13	Клон 13 N31S	Клон 15
ЭК50 (нМ)	1.24	0.7	1.29

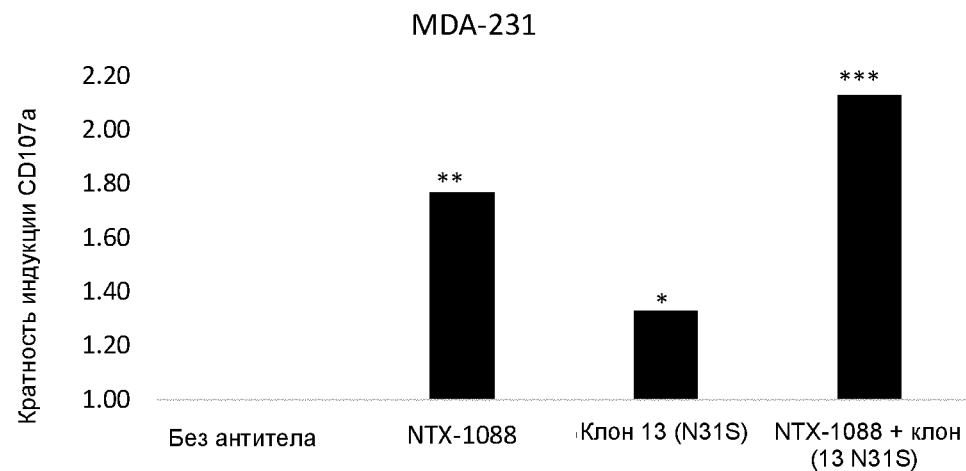
Фигура 3В



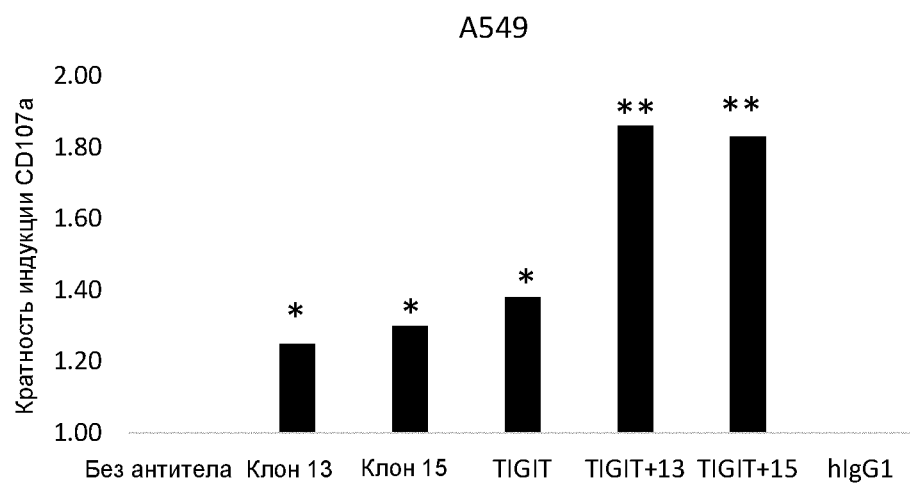
Фигура 3С



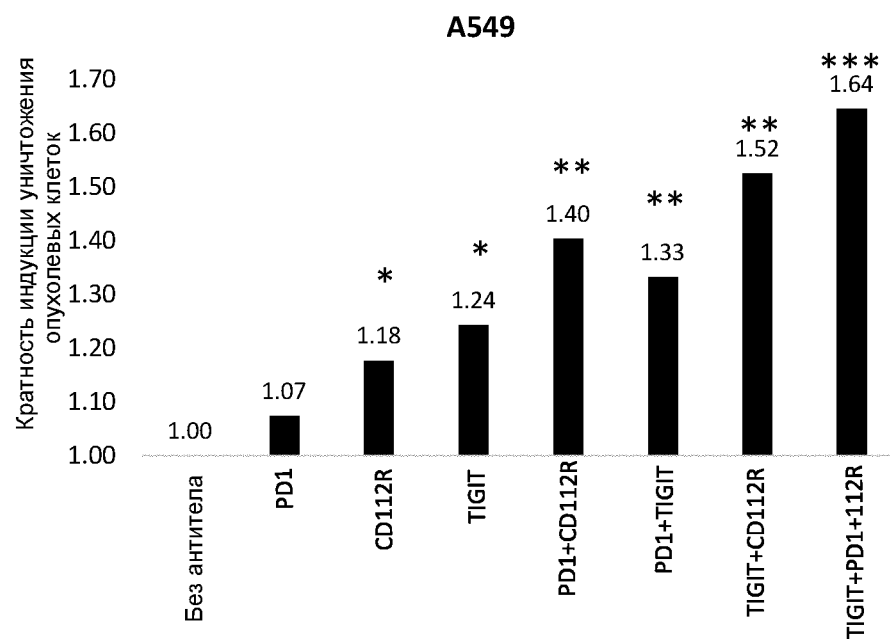
Фигура 4А



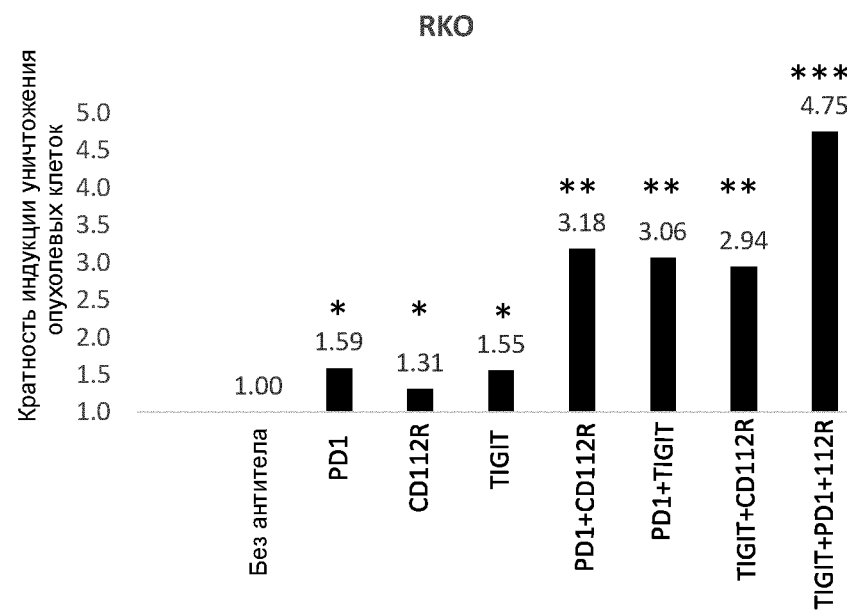
Фигура 4С



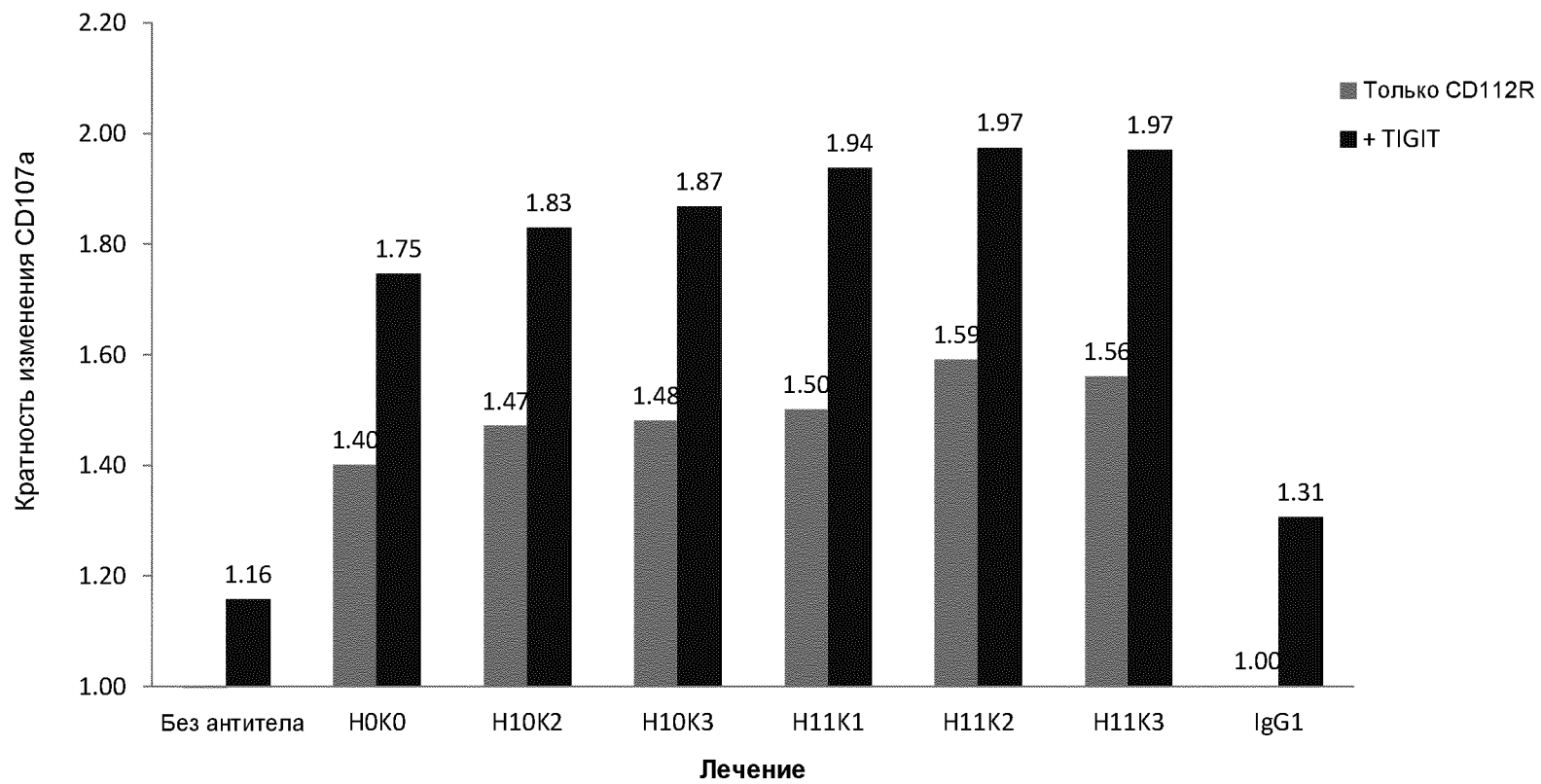
Фигура 4В



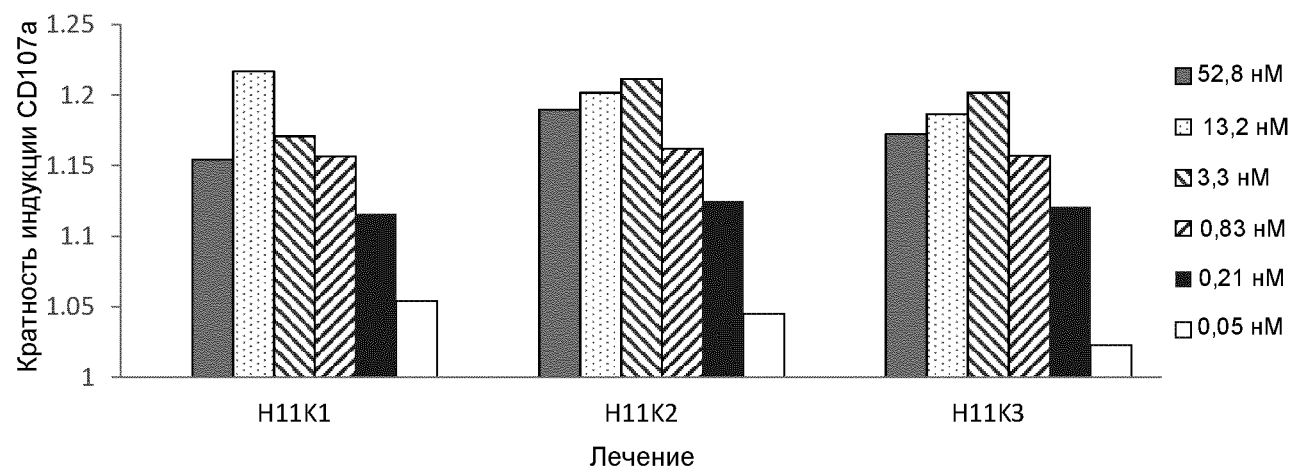
Фигура 5А



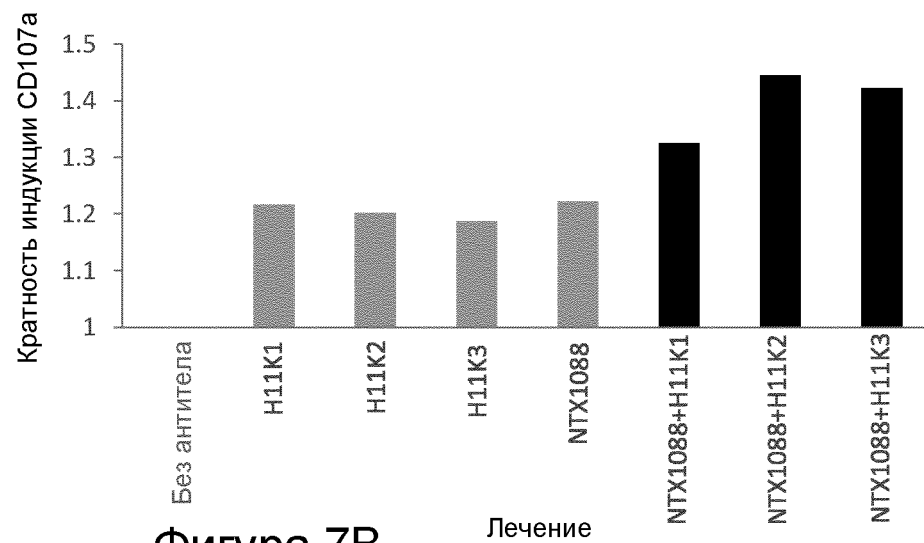
Фигура 5В



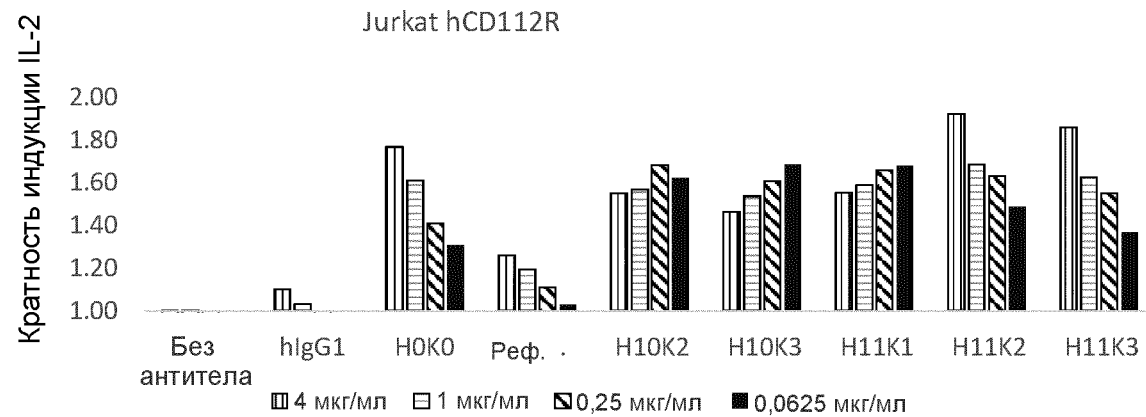
Фигура 6



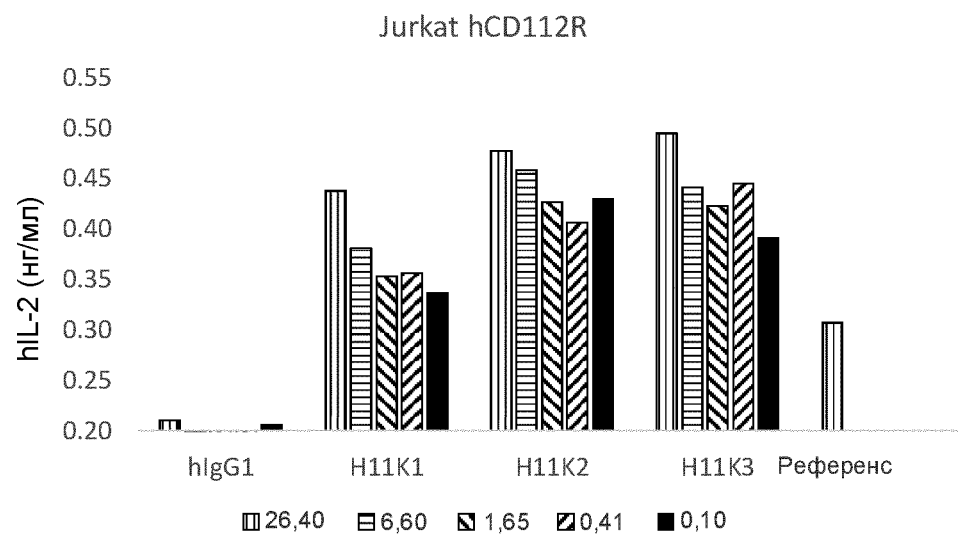
Фигура 7А



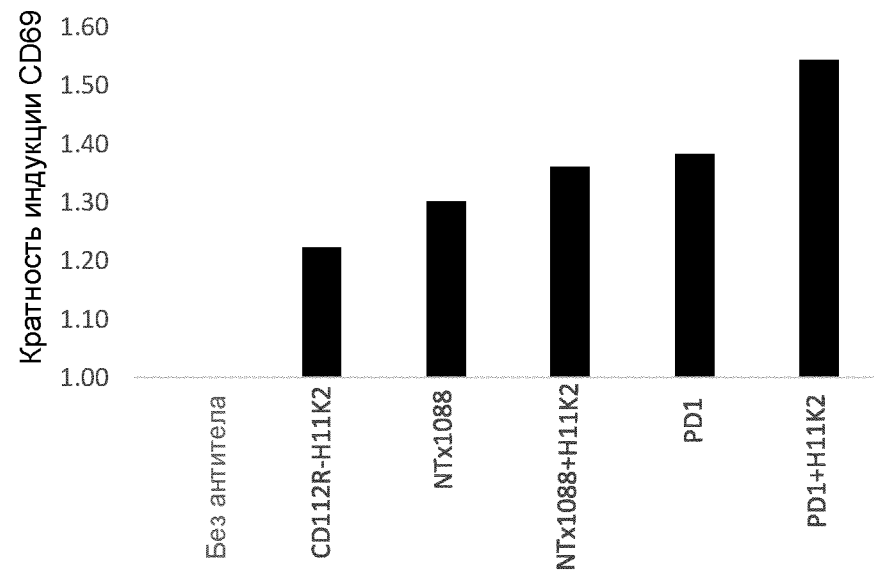
Фигура 7В



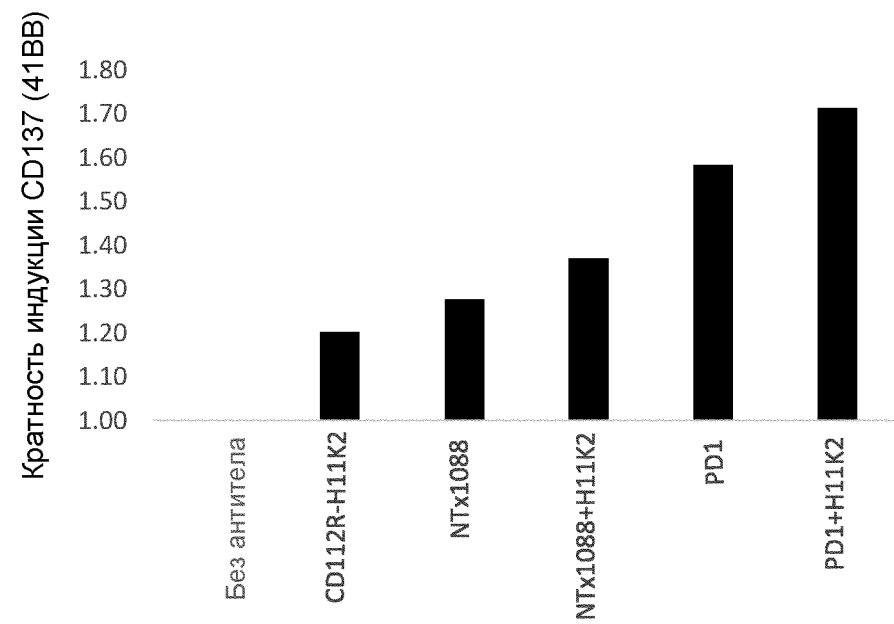
Фигура 8А



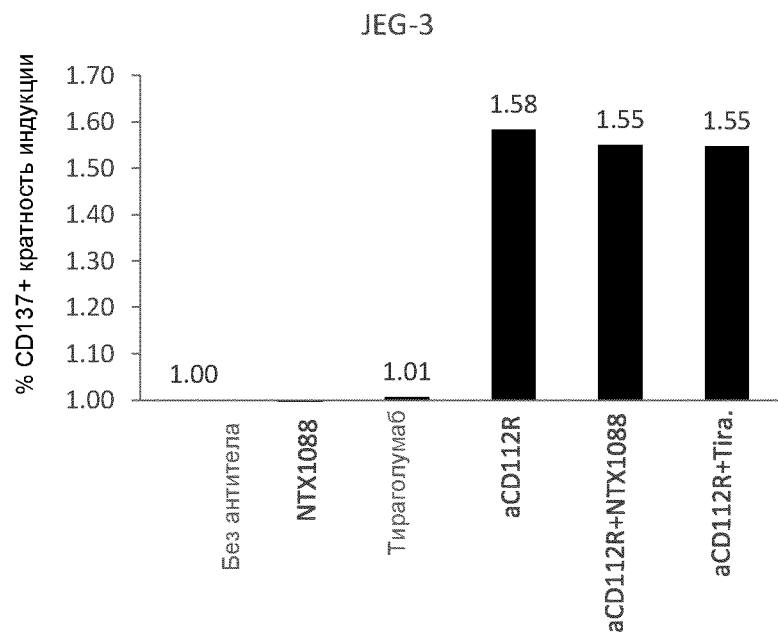
Фигура 8В



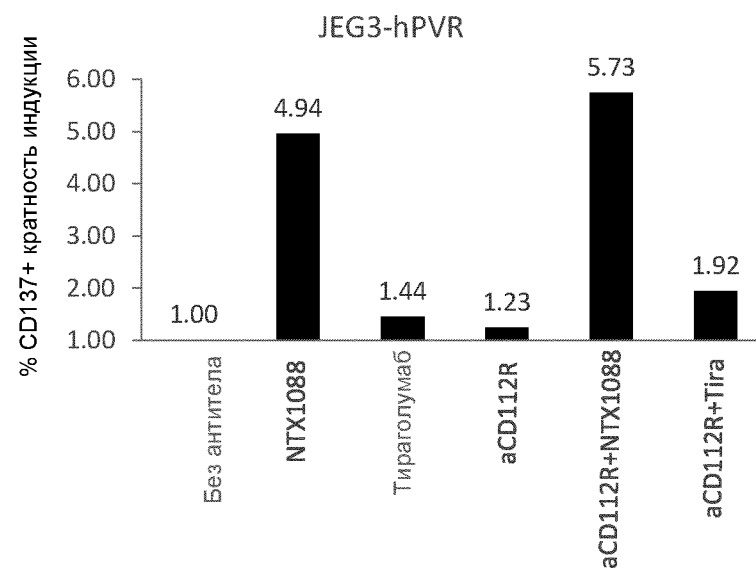
Фигура 9А



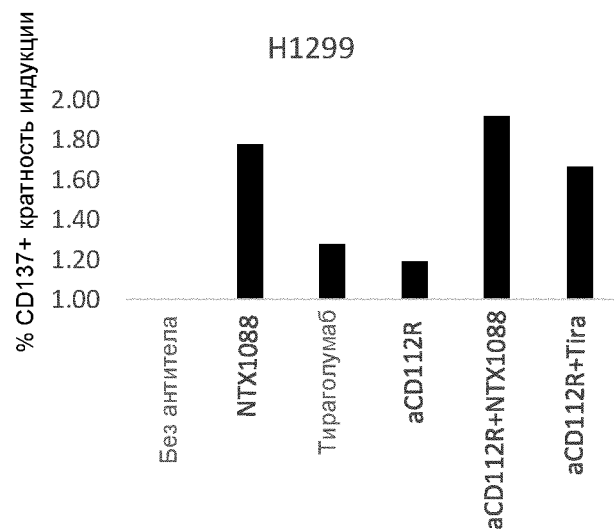
Фигура 9В



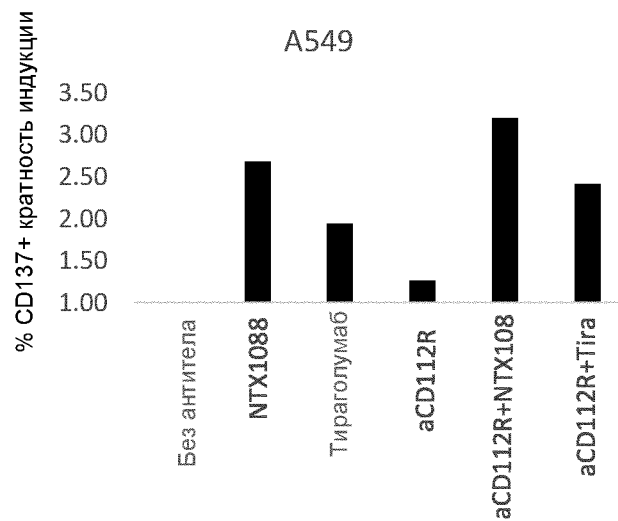
Фигура 10А



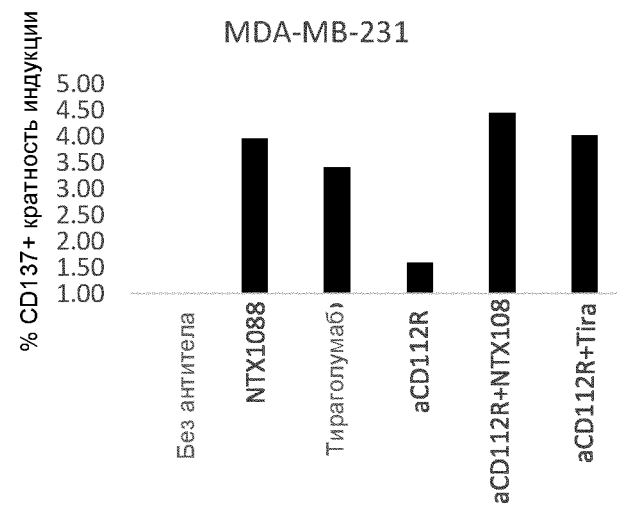
Фигура 10В



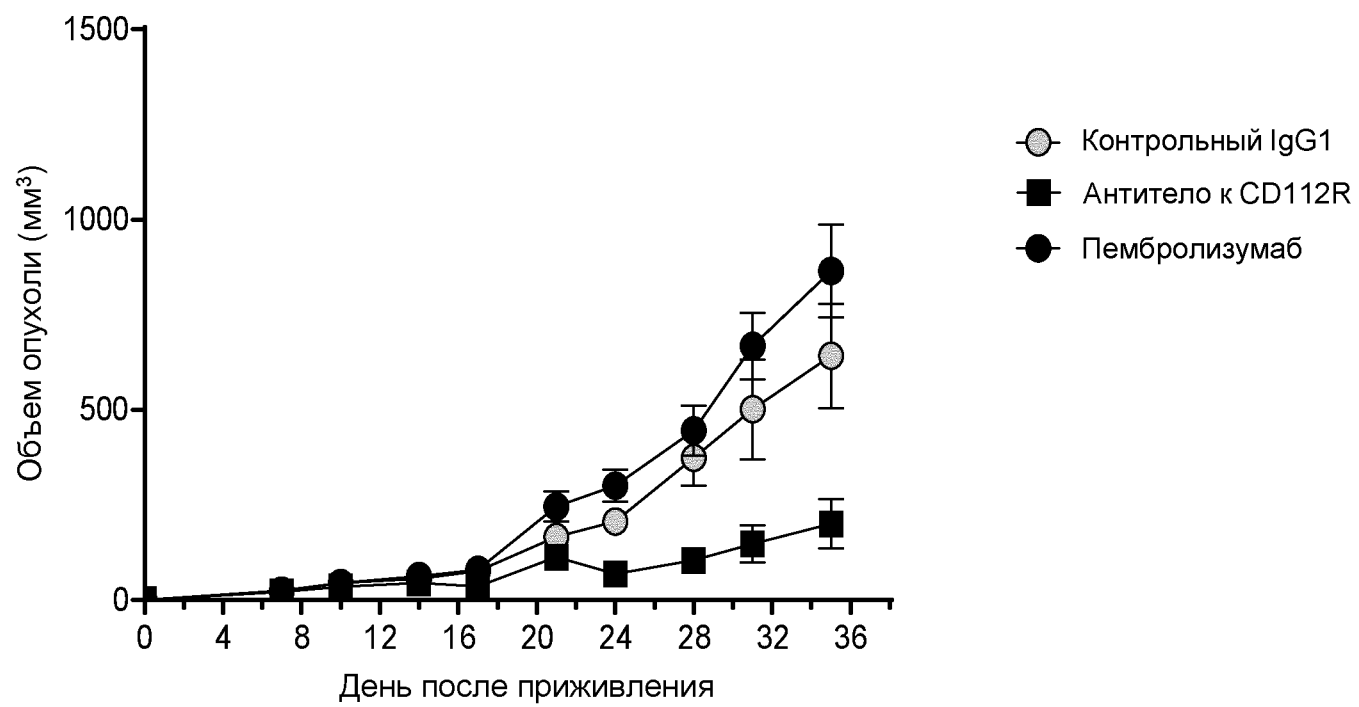
Фигура 11А



Фигура 11В



Фигура 11С



Фигура 12